

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM BIOKONVERZE CELULOSOVÉHO ODPADU NA ETHANOL S
VYUŽITÍM KVASINKOVÝCH SYSTÉMŮ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. IVETA ČALOVÁ

BRNO 2015



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ
ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ
FACULTY OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

STUDIUM BIOKONVERZE CELULOSOVÉHO ODPADU NA ETHANOL S VYUŽITÍM KVASINKOVÝCH SYSTÉMŮ

A BIOCONVERSION STUDY OF CELLULOSIC WASTE TO ETHANOL USING YEASTS SYSTEMS

DIPLOMOVÁ PRÁCE
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE
AUTHOR

Bc. IVETA ČALOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE
SUPERVISOR

Ing. Mgr. LIBOR BABÁK, Ph.D.

BRNO 2015



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0818/2013	Akademický rok: 2014/2015
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	Bc. Iveta Čalová	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.	
Konzultanti:	Ing. Petra Šupinová	

Název diplomové práce:

Studium biokonverze celulosového odpadu na ethanol s využitím kvasinkových systémů

Zadání diplomové práce:

- 1) výběr celulosového odpadu a volba kvasinkových systémů
- 2) rešerše literatury na téma práce
- 3) zpracování metodické části
- 4) provedení vlastních biokonverzí ve snaze o maximalizaci produkce bioethanolu
- 5) aplikace analytických metod ke stanovení sledovaných látek v odebraných vzorcích
- 6) diskuse, vyhodnocení, závěr

Termín odevzdání diplomové práce: 11.5.2015

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Iveta Čalová
Student(ka)

Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 30.1.2015

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Diplomová práce pojednává o optimalizaci produkce ethanolu z odpadního papíru pomocí kvasinek. Jako substrát byly použity 4 druhy papíru – kancelářský papír, nerecyklovaný sešit, recyklovaný sešit a noviny. Všechny papíry byly předupraveny následujícími postupy mletí, mikrovlny + NaOH, mikrovlny + H₂SO₄ a mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH. Pomocí enzymů byla provedena enzymatická hydrolýza, při které byla stanovena koncentrace glukózy pomocí HPLC. Pro produkci ethanolu byly vybrány kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Produkce ethanolu probíhala při simultánní sacharifikaci a fermentaci se všemi předupravenými papíry.

Během hydrolýzy dosahovaly nejvyšších výsledků papíry předupravené kombinací mikrovln + H₂SO₄ + NaOH. Jedinou výjimku tvořil nerecyklovaný sešit, kde byla nejvyšší koncentrace glukózy získána předúpravou mikrovlny + H₂SO₄. Bylo dosaženo těchto výsledků: kancelářský papír 24,69 g·dm⁻³, nerecyklovaný sešit 22,47 g·dm⁻³, recyklovaný sešit 16,94 g·dm⁻³ a noviny 15,36 g·dm⁻³. SSF byla provedena opět se všemi papíry a jejich předúpravami. Nejvyšších koncentrací ethanolu bylo dosaženo u předúpravy mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH. Celkově nejvyšší koncentrace byla získána z kancelářského papíru a činila 16,98 g·dm⁻³. U nerecyklovaného sešitu dosahovala maximální koncentrace ethanolu 15,25 g·dm⁻³, v případě recyklovaného sešitu 12,2 g·dm⁻³ a u novin 12,59 g·dm⁻³.

ABSTRACT

This diploma thesis deals with the optimization of the production of ethanol from waste paper using yeast. There were used 4 kinds of paper as a substrate - office paper, non-recycled workbook, recycled workbook and newspaper. All papers were pretreated with the following procedures: grinding, microwaves + NaOH, microwave + H₂SO₄ and microwave + H₂SO₄ + NaOH. The glucose concentration was determined in enzymatic hydrolysis by HPLC. *Saccharomyces cerevisiae* were chosen for ethanol production. The production of ethanol was carried out with all the pretreated papers in simultaneous saccharification and fermentation.

During hydrolysis, the pretreated papers have reached the highest results in the combination with microwave + H₂SO₄ + NaOH. Non-recycled workbook was the only exception, where the highest concentration of glucose has been obtained by the pretreatment of microwaves + H₂SO₄. Following results have been acquired: office paper 24,69 g·dm⁻³, non-recycled workbook 22,47 g·dm⁻³, recycled workbook 16,94 g·dm⁻³ and newspapers 15,36 g·dm⁻³. SSF was carried out again with all the papers and their pretreatments. The highest concentration of ethanol has been achieved in microwave pretreatment + H₂SO₄ + NaOH. The highest overall concentration has been gained from the office paper, amounted to 16,98 g·dm⁻³. The maximum concentration of ethanol for non-recycled workbook has been 15,25 g·dm⁻³, for recycled workbook 12,2 g·dm⁻³ and for newspapers 12,59 g·dm⁻³.

Klíčová slova

Bioethanol, lignocelulózový materiál, *Saccharomyces cerevisiae*, enzymy, hydrolýza, simultánní sacharifikace a fermentace.

Keywords

Bioethanol, lignocellulosic material, *Saccharomyces cerevisiae*, enzymes, hydrolysis, simultaneous saccharification and fermentation.

ČALOVÁ, I. *Studium biokonverze celulosového odpadu na ethanol s využitím kvasinkových systémů*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2015. XY s. Vedoucí diplomové práce Ing. Mgr. Libor Babák, Ph.D..

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu práce Ing. Mgr. Liboru Babákovi, Ph.D. za odborné rady a připomínky při tvorbě práce. Dále chci poděkovat Ing. Petře Šupinové jako konzultantce, která mi vždy byla nápomocná při řešení experimentů a práci v laboratoři. V neposlední řadě patří mé poděkování za pomoc při práci v laboratoři Ing. Heleně Hudečkové.

OBSAH

1	Úvod.....	7
2	Teoretická část.....	8
2.1	Základní pojmy	8
2.2	Papír	8
2.2.1	Výroba papíru	9
2.3	Odpadní papír.....	9
2.4	Lignocelulóza.....	10
2.4.1	Celulóza	11
2.4.2	Hemicelulóza	11
2.4.3	Lignin.....	12
2.5	Metody předúpravy lignocelulózového materiálu	12
2.5.1	Fyzikální předúpravy	13
2.5.2	Fyzikálně – chemické metody	13
2.5.3	Chemické metody	14
2.5.4	Biologické metody.....	14
2.6	Enzymatická hydrolýza a celulázy.....	15
2.6.1	Mechanismus enzymatické hydrolýzy.....	15
2.7	Metoda simultánní sacharifikace a fermentace	16
2.8	Vsádkový způsob fermentace	16
2.9	Mikroorganismy používané pro produkci bioethanolu.....	18
2.9.1	<i>Zymomonas mobilis</i>	18
2.9.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
2.10	Růstová křivka	20
2.11	Bioethanol	20
2.11.1	Separace a odvodnění bioethanolu	20
2.12	Analytické metody	21
2.12.1	Turbidimetrie	21
2.12.2	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie – HPLC.....	21
3	Experimentální část	24
3.1	Použité enzymy, chemikálie a přístroje	24
3.1.1	Enzymy	24
3.1.2	Chemikálie.....	24
3.1.3	Přístroje.....	24
3.2	Použitá kultura	25
3.3	Použitý substrát	25
3.4	Příprava roztoků	25

3.4.1	Médium pro <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25
3.4.2	Roztoky pro stanovení celulózy	26
3.4.3	Roztoky pro předúpravu papíru	26
3.4.4	Příprava pufu	26
3.4.5	Mobilní fáze pro HPLC	26
3.4.6	Příprava kalibračních roztoků.....	26
3.5	Stanovení růstové křivky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
3.6	Předúprava papíru	27
3.6.1	Mokrý a suchý mletí	27
3.6.2	Mikrovlnná trouba + H ₂ SO ₄	27
3.6.3	Mikrovlnná trouba + NaOH	27
3.6.4	Mikrovlnná trouba + H ₂ SO ₄ + NaOH.....	27
3.7	Analýza substrátu.....	28
3.7.1	Stanovení gramáže papíru	28
3.7.2	Stanovení sušiny papíru.....	28
3.7.3	Stanovení popela.....	28
3.7.4	Stanovení celulózy.....	28
3.8	Enzymatická hydrolýza.....	29
3.9	Simultánní sacharifikace a fermentace – SSF.....	29
3.10	Stanovení množství metabolitů pomocí HPLC.....	29
3.11	Statistické zpracování výsledků	30
4	Výsledky a diskuze.....	31
4.1	Kultivace a stanovení růstových křivek	31
4.2	Analýza substrátu.....	33
4.2.1	Stanovení gramáže papíru	33
4.2.2	Stanovení sušiny papíru.....	34
4.2.3	Stanovení popela.....	34
4.2.4	Stanovení celulózy.....	35
4.3	HPLC analýza	37
4.3.1	Kalibrační křivky	37
4.3.2	Enzymatická hydrolýza	38
4.4	Simultánní sacharifikace a fermentace – SSF.....	46
5	Závěr.....	60

1 ÚVOD

V současnosti neustále vzrůstá spotřeba fosilních paliv, což má za následek zvyšování produkce koncentrace CO_2 v ovzduší. Tato skutečnost přispívá k výraznému nárůstu skleníkového efektu. Dalším problémem je vyčerpatelnost těchto zdrojů a to je i důvod pro neustálé zvyšování cen fosilních paliv. Je tedy nutné postupně nahrazovat fosilní paliva alternativními zdroji. Jsou jimi například paliva 2. generace, kam řadíme i bioethanol.

Nejen používání bioethanolu jako paliva, ale také jeho produkce mohou mít příznivý vliv na životní prostředí. Neustále vzniká mnoho odpadního materiálu, pro který již není další využití a jeho likvidace je často velice nákladná. Mezi odpadní suroviny řadíme i lignocelulózový materiál, který je možnou surovinou pro výrobu bioethanolu. Mezi zdroje lignocelulózového materiálu patří zemědělské plodiny (sláma, traviny), ale důležitými zdroji jsou také produkty dřevařského a papírenského průmyslu.

Bioethanol se přidává jako příměs do benzínu, kde zvyšuje jeho oktanové číslo a to má za následek snížení emisí CO_2 během jeho spalování. Nejedná se však jen o menší emise CO_2 , ale také dalších škodlivin jako oxidy dusíku, CO, oxidy síry a organické sloučeniny. Samozřejmě má bioethanol i negativní stránky a to je produkce aldehydů během jeho spalování. Tento nedostatek je možno řešit kvalitním katalyzátorem ve vozidle, který tyto aldehydy pohltí.

Faktory, které je nutno také zohlednit, jsou metody zpracování a úprava lignocelulózového materiálu. Nejvíce používané jsou chemické předúpravy, ale jejich nákladnost a následné zatížení životního prostředí vznikajícím odpadem je neatraktivní. Proto se hledají další možnosti předúprav jako například enzymatická hydrolýza. Hledají se možnosti jak enzymy získávat pomocí mikroorganismů aby se náklady na jejich výrobu ještě snížily.

Pro produkci bioethanolu se nejčastěji používají kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, které jsou již v biotechnologiích osvědčeným producentem lihu. Je možno využívat dalších druhů kvasinek, například *Kluyveromyces marxianus* nebo pivovarské kvasinky *Saccharomyces carlsbergensis*. Mezi dobré producenty ethanolu řadíme i bakterie *Zymomonas mobilis* u kterých jsou stále zkoumány a vylepšovány podmínky produkce a jejich odolnost.

Cílem této práce bylo optimalizovat produkci bioethanolu z lignocelulózového materiálu pomocí *Saccharomyces cerevisiae*. Práce vychází z experimentů z předchozích diplomových prací na toto téma. Jako lignocelulózový materiál byl použit papír s různým stupněm recyklace (kancelářský papír, nerecyklovaný sešit, recyklovaný sešit a noviny). Byl sledován vliv jednotlivých předúprav na získání glukózy, ale také vliv použitého papíru. Bioethanol byl produkován systémem simultánní sacharifikace a fermentace.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Základní pojmy

Bioethanol

Kapalné biopalivo vyráběné pomocí alkoholového kvašení, kdy dochází k utilizaci sacharidické složky biomasy. Jedná se o palivo vyráběné z obnovitelných zdrojů. [1]

Biomasa

Jako biomasa jsou označovány biologicky rozložitelné materiály rostlinného a živočišného původu. Jedná se o produkty zemědělství, dřevařského průmyslu a běžného odpadního materiálu. Obsahuje složky, které je možno využít jako zdroj energie. [2]

Lignocelulózový materiál

Materiál, jehož hlavními stavebními kameny jsou celulóza, hemicelulóza a lignin. Je to především produkt zemědělství, dřevařství a odpadních papírů. Vhodnými úpravami je z něj možno získat fermentovatelné cukry a následně bioethanol. [3]

Saccharomyces cerevisiae

Kvasinky produkující ethanol jako primární metabolit. Hojně používané v biotechnologiích při výrobě kvašených alkoholických nápojů. Fakultativně anaerobní mikroorganismy, které využívají jako svou metabolickou dráhu glykolýzu. [4]

Enzymy

Enzymy jsou látky bílkovinné povahy s katalytickými vlastnostmi. Od anorganických katalyzátorů se liší především substrátovou specifitou a většinou vyšší reakční rychlostí. V dnešní době mají enzymy velmi široké využití v mnoha průmyslových odvětvích. [5]

Hydrolýza

Štěpení molekul za působení katalyzátoru a přebytku vody. Reakce neprobíhá za běžných teplot a pH, protože aktivační energie této reakce jsou vysoké. [5]

2.2 Papír

Papír se vyrábí zplstněním jemných rostlinných vláken ve vodném prostředí pomocí síta. Hmotnost papíru je přibližně do 150 g.m⁻², těžší papíry označujeme jako karton a při gramáži 300 g.m⁻² se již jedná o lepenku. [6]

Podle účelu pro který je papír určen jej můžeme rozdělit do několika kategorií:

- Grafický papír – je určen převážně pro různé druhy potisku, používá se do tiskáren a kopírek, ale také na psaní a kreslení.
- Balicí papír – slouží jako ochrana nejrozličnějších výrobků od potravin až po průmyslové zboží.
- Technický papír – vyrábí se pro použití v technických směrech. Jsou to například papíry kabelové, do kondenzátorů nebo elektroizolační.
- Speciální papír – tyto papíry se speciálně upravují podle druhu jejich použití. Do této kategorie řadíme cigaretové papírky, krepový papír, papír pro balení čajových sáčků. [7]

Pro výrobu papíru je základní surovinou dřevo, respektive dřevěná vlákna. Mezi jednotlivými druhy dřevin jsou však velké rozdíly, dřevo jehličnanů je pro výrobu papíru vhodnější z hlediska výtěžnosti. Vlákna listnatých stromů se přidávají do papíru pro vyplnění prostoru dlouhých vláken z jehličnanů, tím má papír uzavřenější povrch a lepší potiskové vlastnosti. [6]

2.2.1 Výroba papíru

Výrobu je možno rozdělit na dvě základní fáze

1. příprava papíroviny
2. zpracování papíroviny na papírenském stroji. [6]

Příprava papíroviny zahrnuje operace rozvlákňování, mletí, plnění, klížení a barvení. Během těchto procesů dochází ke změně rozměrů dřevěných vláken ve všech směrech (příčný, podélný), zvětšuje se aktivní povrch a vlákna bobtnají. [6]

V papírenském stroji probíhá hned několik procesů. V nátokové skříní dochází k natečení papíru na papírenské síto, které je vyrobeno ze syntetických vláken. Následuje odvodňování papíroviny až na 40% obsah sušiny. Lisováním v několika za sebou zapojených lisech se odstraňuje další voda. Sušinu o 95 % získáváme pomocí rozehřátých sušících válců a následně je list papíru ochlazen a vstupuje do kalandru. Kalandrováním dostáváme papír hladký a tenčí. Takto připravený papír se následně navíjí na bubny a přesouvá se na finální úpravy jako převíjení, řezání na archy, třídění, balení do kotoučů a vážení. [6]

2.3 Odpadní papír

Většina odpadního papíru se recykluje a dochází opětovně k jeho výrobě. Je nutné papír správně třídit aby mohl být znovu využit. [8]



Obrázek 1: Modrý kontejner na sběrový papír

Jaký papír je vhodné třídit:

- noviny a časopisy
- sešity, bloky, indexy a žákovské knížky
- knihy (pouze s měkkým obalem)
- kancelářský papír
- krabice, kartony a lepenky
- potravinové obaly (mouka, cukr, sůl atd.)
- dopisy, účtenky, složenky [8]

Do tříděného papíru nepatří jakkoliv znečištěný papír, nápojové kartony, použité papírové kapesníky a utěrky. Papír však není možné recyklovat stále dokola, většinou je využit 5krát až

7krát. Velkou výhodou recyklace je menší spotřeba energie a vody než při výrobě papíru ze surového dřeva. [8]

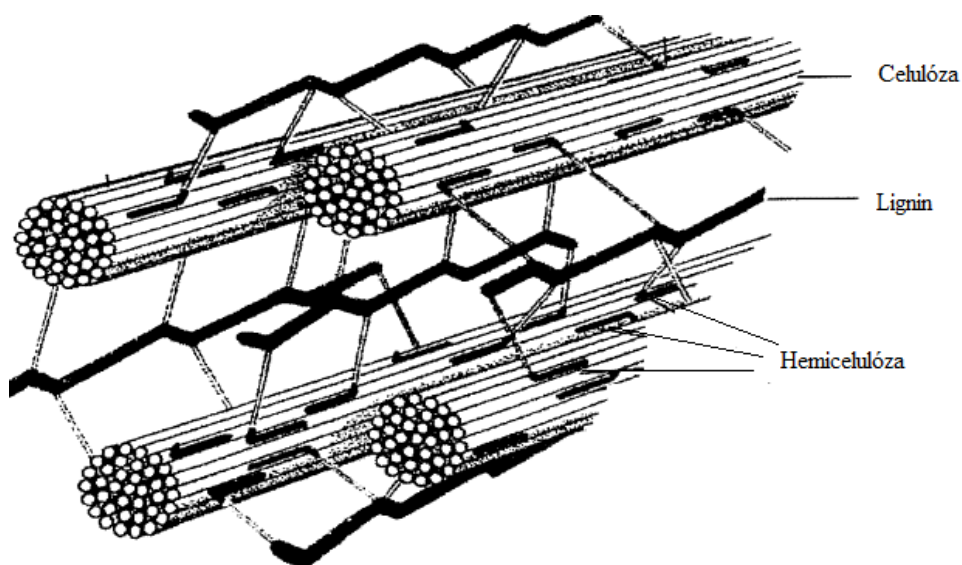
Další možností zpracování odpadního papíru je získávání energie jeho spalováním. Za určitých podmínek se spalování papíru podobá spalování biomasy. Při nastavení optimálních podmínek dochází k vytváření pouze CO₂, který je dále zpracováván nově rostoucí biomasou procesem fotosyntézy. Spalováním papíru je možno získat až 15 MJ využitelné energie. Výběr správného materiálu je v tomto případě velmi důležitý, papír nesmí obsahovat velké množství plnidel a barviv, proto jsou časopisy a reklamní letáky naprosto nevhodné. [9]

Sběrový papír má v poslední době zvláště velký význam pro výzkum výroby biopaliv právě z tohoto materiálu. Jsou zde samozřejmě daleko atraktivnější materiály z hlediska produkce bioethanolu, jako například cukrová třtina či cukrová řepa. Tyto suroviny jsou však primárně využívány jako potraviny, proto se od nich v posledních letech upouští a pro produkci bioethanolu jsou hledány nové suroviny. Metody zpracování odpadního papíru pro výrobu bioethanolu jsou popsány v dalších kapitolách této práce. [8]

2.4 Lignocelulóza

Lignocelulózová biomasa je jedním z nejdostupnějších materiálů pro výrobu bioethanolu. Možností odkud čerpat je mnoho ať už jsou to zbytky ze zemědělství, lesního hospodářství či tuhý komunální odpad v podobě papírů. [10]

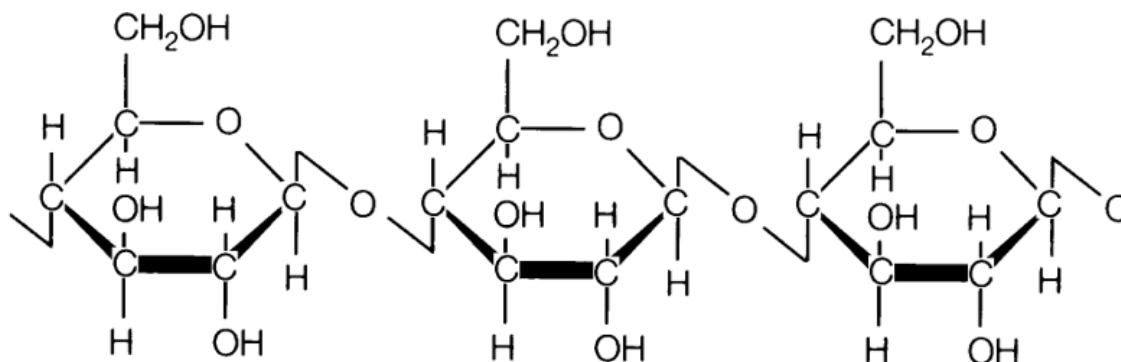
Lignocelulóza se skládá ze 3 základních stavebních kamenů: celulóza, hemicelulóza a lignin. Lignin se váže na polymery celulózu a hemicelulózu prostřednictvím kovalentních vazeb. Lineární celulózové řetězce zabezpečují pevnost rostlinných buněčných stěn a lignin slouží jako ochranná vrstva proti chemickým vlivům a vodě. Celulózu a lignin spojuje hemicelulóza. Díky odolnosti tohoto materiálu jsou zde překážky v jeho hydrolýze a ta často bývá velmi náročná. Lignin chrání celulózu proti působení mikrobiálních celuláz a samotná krystalická struktura celulózy je velmi odolná. [10]



Obrázek 2: Struktura lignocelulózy [11]

2.4.1 Celulóza

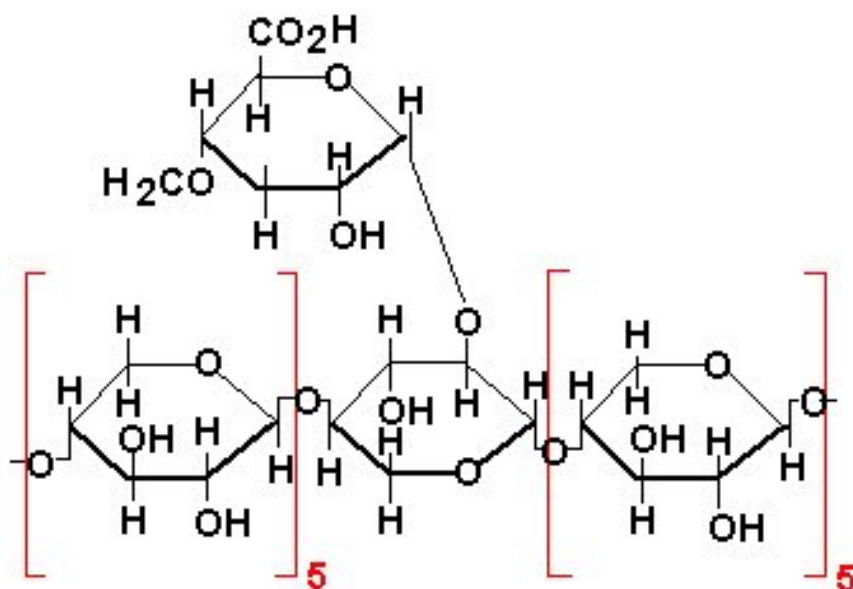
Jedna z hlavních složek lignocelulózového materiálu je celulóza. Je to polysacharid tvořený D-glukózovými jednotkami, které jsou lineárně spojeny β -(1 \rightarrow 4) glykosidickou vazbou. Jednotlivé glukózové řetězce jsou pevně vázány působením Van der Waalsových sil a díky tomu převládá krystalická struktura. Řetězce celulózy mají lineární charakter a působením Van der Waalsových sil tvoří fibrily, jejich velikost je v rozsahu 5 – 20 nm a vzdálenost mezi jednotlivými fibrilami se pohybuje v rozsahu 20 – 45 nm. [1, 12]



Obrázek 3: Struktura celulózy [13]

2.4.2 Hemicelulóza

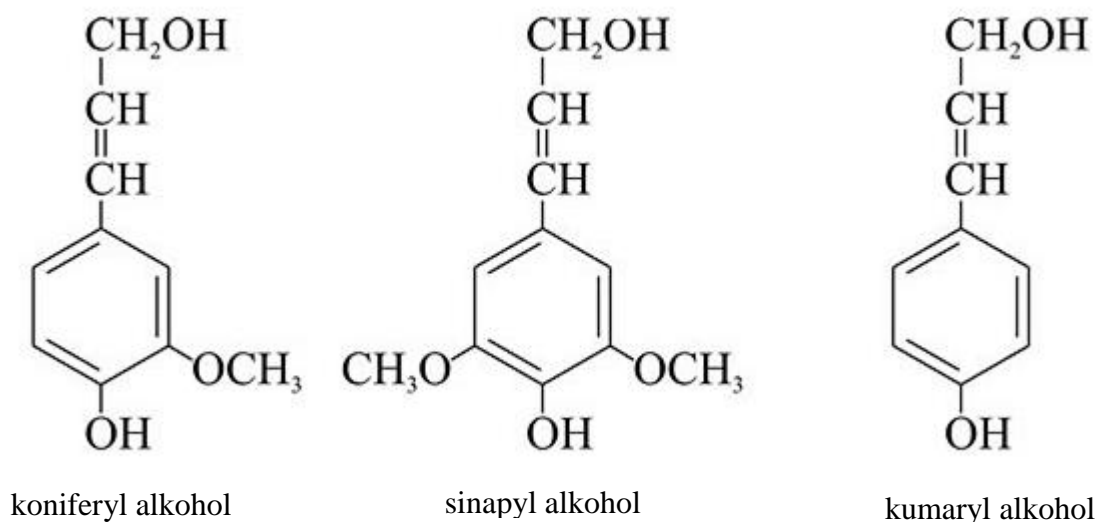
Hemicelulóza je polysacharid složený z různých hexóz (D-manóza, D-galaktóza) a také pentóz (D-arabinóza, D-xylóza). Mezi významné složky hemicelulózy patří i xylan, což je polysacharid složený z xylóz a vyskytuje se hlavně v tvrdých dřevinách a rostlinách. Naopak v měkkém dřevě je převážně glukomanan, polysacharid tvořený D-manózou a D-glukózou. Hemicelulóza se váže vodíkovými můstky na celulózové fibrily a společně tvoří síť, která je základem buněčné stěny rostlin. Hemicelulóza představuje tepelně a chemicky nejméně stabilní složku lignocelulózového materiálu. [12, 14]



Obrázek 4: Struktura hemicelulózy [13]

2.4.3 Lignin

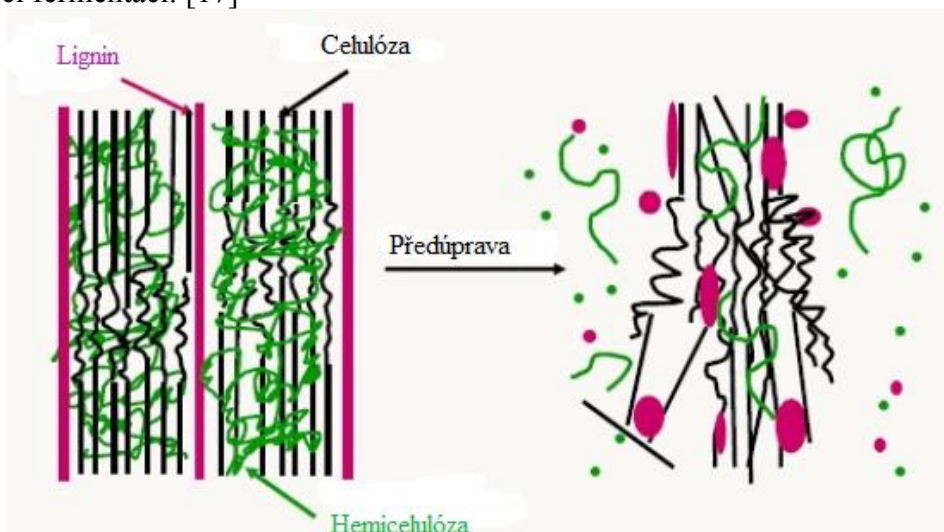
Jedna z hlavních stavebních složek dřevin, zvyšuje pevnost struktury rostlinného pletiva a zároveň působí jako permeabilní membrána pro vodu. Má taky ochranné funkce, kdy chrání rostlinu proti škůdcům, patogenům a chorobám. Lignin tvoří 20 – 35 % dřevní struktury. Je to vysokomolekulární látka fenolického charakteru a skládá se ze 3 monomerních alkoholů: kumaryl alkoholu, koniferyl alkoholu a sinapyl alkoholu. Kovalentně se váže na postranní řetězce hemicelulózy a tvoří tak ochranný obal okolo celulóзовých fibril, což velmi negativně přispívá k náročnosti a ceně předúpravy lignocelulóзовého materiálu. [15]



Obrázek 5: Strukturní jednotky ligninu. [16]

2.5 Metody předúpravy lignocelulóзовého materiálu

Předúprava materiálu je jedním z nejdůležitějších kroků při výrobě bioethanolu. Cílem je oddělení jednotlivých komponent a zpřístupnění žádoucí složky pro další zpracování. V případě lignocelulózy se jedná o odstranění ligninu a hemicelulózy a tím zvýšení celkové poréznosti materiálu a zvýšení dostupnosti celulózy. Předúprava musí být efektivní, nesmí při ní vznikat velké množství vedlejších produktů, které by následně mohly působit jako inhibitory na hydrolýzu či fermentaci. [17]



Obrázek 6: Ukázka průběhu předúpravy lignocelulóзовého materiálu. [17]

Předúpravy můžeme rozdělit do několika kategorií:

- fyzikální
- fyzikálně – chemické
- chemické
- biologické [17]

2.5.1 Fyzikální předúpravy

Suché a mokré mletí

Mletí je vůbec prvním krokem při předúpravách materiálu a používá se velmi často i díky své jednoduchosti. Používají se kombinace mletí, drcení a sekání. Částice, které procesem mletí získáváme, mívají velikost 0,2 – 2 mm, tím dochází k zvětšení povrchu a usnadnění dalších operací. Během mletí však nedochází k oddělení jednotlivých částí od sebe (celulóza, hemicelulóza, lignin), ale docílíme nižšího stupně polymerace. Ekonomická náročnost u tohoto procesu závisí na použitém zařízení a materiálu. [19]

Pyrolýza

Proces působení teploty vyšší než 300 °C na celulóзовý materiál, při kterém dochází k rozkladu na plynné produkty jako H₂ a CO a uhlíkatý zbytek. Operace probíhá za nepřístupu vzduchu. Kombinací pyrolýzy a kyselé hydrolýzy je možno dosáhnout vysokých výtěžků redukujících cukrů a až 50% podílu glukózy. Tato metoda se však pro předúpravu příliš nepoužívá, protože při vyšších teplotách dochází k rozkladu ligninu na jednotlivé fenolické sloučeniny, které následně působí jako inhibitory růstu kvasinek. [20]

Mikrovlnné záření

V dnešní době velmi zkoumaná a slibná předúprava materiálu, která může zefektivnit samotnou enzymatickou hydrolýzu. Většinou se provádí v kombinaci s kyselou nebo alkalickou předúpravou aby se docílilo ještě lepších výsledků. Celulóзовé komponenty mohou být degradovány pomocí mikrovln na křehká vlákna a oligosacharidy nízkých molekulových hmotností. Je možno docílit rozkladu až na samotnou celobiózu. Tato metoda je však poněkud náročnější na spotřebu elektrické energie a zatím se v průmyslu tolik nevyužívá. [21]

2.5.2 Fyzikálně – chemické metody

Parní exploze

Parní exploze je jedna z nejpoužívanějších fyzikálně – chemických předúprav lignocelulóзовé biomasy. Je to hydrotermální metoda, při které je biomasa vystavena působení stlačené páry v čase od sekund až po několik minut. Tato předúprava kombinuje mechanické síly a chemické efekty, které vedou k hydrolýze acetylových skupin hemicelulózy. K autohydrolýze dochází při vysokých teplotách, kdy z acetylových skupin vzniká kyselina octová a kromě toho i samotná voda může při takto vysokých teplotách působit jako kyselina. Mechanické účinky působí v momentě snížení tlaku na jednotlivá vlákna a následně dojde k jejich oddělení v důsledku explozivní dekomprese. Díky částečné hydrolýze hemicelulózy je pak možno z materiálu odstranit i lignin. Celulóza je pak daleko přístupnější pro enzymy, které jsou používány ke kompletní hydrolýze. [22]

Exploze za použití amoniaku (AFEX)

Biomasa je zpracovávána působením kapalného bezvodého amoniaku při teplotách 60 °C až 100 °C a vysokého tlaku. Poté se tlak uvolní, což má za následek expanzi amoniakálního plynu, který způsobuje bobtnání a fyzikální narušení vláken lignocelulózy a částečnou dekrystalizaci

celulózy. Oproti parní explozi, kde získáváme část kapalného podílu, který je možno následně oddělit, AFEX produkuje pouze předem upravený pevný materiál. [22]

Exploze CO₂

Exploze CO₂ byla vyvinuta za účelem snížení nákladů, které jsou potřeba při metodě AFEX. CO₂ se totiž chová jako superkritická tekutina a to znamená, že pokud jej stlačíme při teplotách vyšších, než jeho kritický bod má pak hustotu jako kapalina. Velikost molekul je srovnatelná s molekulami vody a amoniaku, takže snadno proniká i do malých pórů. Po expanzi dochází k narušení ochranné bariéry (hemicelulóza a lignin) okolo celulózy a tím zpřístupnění pro hydrolýzu. [23, 24]

2.5.3 Chemické metody

Kyselá hydrolýza

Cílem je jako u všech metod předúprav získat vysoký výtěžek sacharidů z lignocelulózových materiálů. Využívají se kyseliny zředěné i koncentrované, jsou zde zahrnuty kyselina sírová, kyselina dusičná nebo kyselina chlorovodíková. Koncentrované kyseliny jsou pro předúpravu účinné, ale příliš se nevyužívají z důvodu vzniku inhibičních produktů, např. furfural a z ligninu uvolněné fenolické sloučeniny. Zředěné kyseliny se proto používají více a to i z finančního hlediska. Nejvíce používanou a zároveň zkoumanou je zředěná kyselina sírová, která má celkem 3 funkce působení. První je hydrolýza hemicelulózy pro výrobu sirupů z jejích monomerních cukrů, druhá je odstranění hemicelulózy a ligninu a zpřístupnění celulózy pro enzymatickou hydrolýzu. Třetí funkce zajišťuje rozpuštění těžkých kovů, které by kontaminovaly životní prostředí. I přes řadu výhod, má použití kyselin několik nevýhod. Je potřeba biomasu neutralizovat, zabránit korozi zařízení a může docházet k tvorbě degradačních produktů a uvolnění inhibitorů kvašení. [25]

Alkalická hydrolýza

Běžně se používají draselné, sodné, amonné a vápenaté hydroxidy. Hydrolýzu a její účinnost nejvíce ovlivňuje obsah ligninu v materiálu. Výhodou je že hydrolýza probíhá při normálních teplotách a tlacích, čím se výrazně snižuje spotřeba energie. Samozřejmě v té chvíli není možno uvažovat o několika vteřinové či minutové operaci, ale hydrolýza probíhá v rozmezí hodin až dnů. Nejhojněji se využívá hydroxidu sodného. Alkalické prostředí způsobuje bobtnání, které výrazně zvětšuje dostupnou plochu pro další zpracování. Dále také dochází k snížení krystalinity celulózy a narušuje strukturu ligninu. [25]

Ozonolýza

Předúprava ozónem je jedním ze způsobů jak snížit obsah ligninu v lignocelulózové biomase. To má za následek zvýšení využitelnosti materiálu a na rozdíl od jiných chemických úprav nedochází k tvorbě toxických zbytků. Ozonolýza se stejně jako alkalická hydrolýza provádí za normální teploty a atmosférického tlaku. Kromě toho je možné ozón rozložit zvýšením teploty, takže procesy mohou být navrženy tak, aby se minimalizovalo znečištění životního prostředí. Nevýhodou je velké množství ozónu, které je potřeba pro tuto operaci a to značně zvyšuje náklady. [23, 24]

2.5.4 Biologické metody

Hlavním cílem biologické předúpravy je degradace hemicelulózy a ligninu. Nejčastěji se za tímto účelem využívají vláknité houby a plísňe. Nejčastěji se využívají a nejúčinnější jsou basidiomycety, jsou to například *Aspergillus tereus*, *Trichoderma resei* atd. Dále je možno využívat i těchto hub:

- *Pleurotus ostreatus*

- *Phanerochaete sordida*
- *Penicillium chrysosporium*
- *Penicillium cameberti*
- *Pycnoporus cinnabarinus*. [26]

Velkou výhodou této metody je šetrnost k životnímu prostředí, díky tomu že nevyužívá žádných chemikálií. Nízké nároky na energii a podmínky pro růst mikroorganismů velmi snižují náklady. Nevýhodou je však poměrně nízká účinnost těchto procesů. [26]

2.6 Enzymatická hydrolýza a celulázy

V přírodě je lignocelulóza degradována komplexem hydrolytických a oxidačních enzymů produkovaných různými druhy plísní a bakterií. Tyto enzymy jsou schopny synergicky degradovat celulózu, hemicelulózu a lignin. Aerobní plísně i bakterie jsou schopny využívat celulózu jako zdroj uhlíku díky produkci větších množství extracelulárních celuláz, které je možno získat z kultivačních médií. Jedná se o komplexní celulázové systémy skládající se z několika podjednotek. Jednotlivé podjednotky na sebe působí synergicky a celulózu degradují. [24, 27]

Ačkoliv struktura a funkce celulázových systémů jsou předmětem intenzivního výzkumu v průběhu posledních 30 let, tak získání efektivní enzymatické hydrolýzy celulózy je pořád velmi obtížné. Heterogenní a nerozpustný charakter lignocelulózového materiálu představuje značné překážky pro celulázové systémy. Znamená to tedy, že rychlost a účinnost enzymatické hydrolýzy je ovlivněna nejen katalytickou účinností enzymů, ale také vlastnostmi substrátu. [27]

Celulázy představují primární skupinu enzymů potřebných k depolymerizaci lignocelulózových substrátů. Celulázový komplex se skládá z endoglukanázy, exoglukanázy a glukosidázy. [27]

Endo- β -(1,4)-glukanáza náhodně štěpí β -(1,4)-glykosidické vazby v celulóze. Vznikají tak oligosacharidy o různé molekulové hmotnosti. Jejich hlavní funkcí je tedy snížení stupně polymerace. [28]

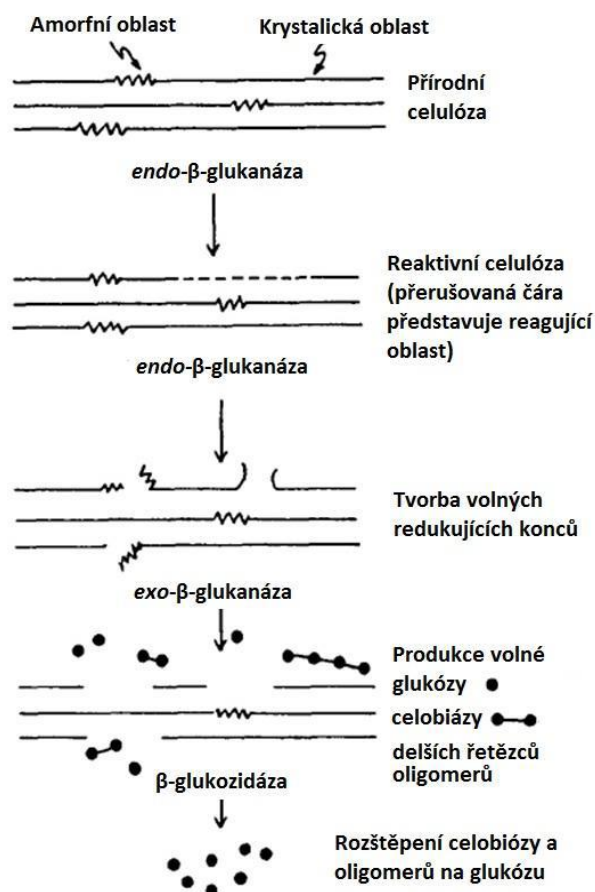
Exo- β -(1,4)-glukanáza se skládá ze dvou funkčních podskupin:

- **β -(1,4)-glukan-glukohydroláza**, která odštěpuje jednotlivé glukózové jednotky z neredukujícího konce řetězce celulózy,
- **β -(1,4)-glukan-celobiohydroláza**, která odštěpuje celobiózové jednotky z neredukujícího konce celulózy. [28]

β -(1,4)-glukosidáza hydrolyzuje celobiózu a krátké řetězce oligosacharidů na glukózu. Nejen, že zvyšuje výtěžek glukózy, ale také odstraňuje celobiózu, která je ve větším množství inhibátorem endo a exoglukanázy. [28]

2.6.1 Mechanismus enzymatické hydrolýzy

Hydrolýza probíhá pomocí celulázového komplexu ve třech krocích. Nejprve dochází ke štěpení vnitřních glykosidických vazeb působením endoglukanázy. Takto naštípané oligosacharidy podléhají působení exoglukanázy, která je dále rozděluje na celobiózu, kterou štěpí glukosidáza za vzniku molekul glukózy. Mechanismus působení je znázorněn na obrázku 5. [28]



Obrázek 7: Mechanismus působení celulázového komplexu [29]

2.7 Metoda simultánní sacharifikace a fermentace

Pro neustálou snahu snižovat náklady na výrobu bioethanolu se zavádí metoda simultánní sacharifikace a fermentace – SSF. Tato metoda v sobě zahrnuje hydrolýzu lignocelulózové biomasy na glukózu, která je okamžitě využívána jako zdroj uhlíku mikroorganismy. Proces tedy probíhá zároveň v jedné baňce či bioreaktoru. [30]

Volba podmínek představuje u tohoto procesu největší komplikaci. Je nutno podmínky nastavit tak aby oba procesy (hydrolýza a fermentace) probíhaly bez větších problémů. Optimální teplota pro celulózy se pohybuje okolo 45 °C, zatímco při použití mezofilních mikroorganismů se teplota kultivace pohybuje v rozmezí 25 – 30 °C. Teplota při SSF se tedy nastavuje na nižší hodnotu, než je teplotní optimum pro enzymy. Možným řešením těchto překážek by mohlo být využití termofilních mikroorganismů, ale tato oblast zatím není příliš prozkoumána. [30]

Metoda separované hydrolýzy a fermentace – SHF odděluje procesy hydrolýzy a fermentace. Nejprve je materiál podroben hydrolýze a pouze čistý hydrolyzát je pak převeden do bioreaktoru, kde pak probíhá fermentace vzniklé glukózy. Výhodou této metody je průběh obou operací za ideálních podmínek, ale doba procesu se zdvojnásobuje a tím pádem rostou i náklady. Proto je preferováno využití SSF. [25]

2.8 Vsádkový způsob fermentace

Vsádkový způsob je běžný pro maloobjemové mikrobiální a tkáňové reaktory. Do reaktoru je před započítím kultivace vloženo fermentační médium a inokulum. Zároveň jsou nastaveny veškeré reakční podmínky. Během kultivace pak probíhá nárůst biomasy a dochází k produkci žádaných metabolitů. Po dosažení požadované koncentrace biomasy, metabolitů či

spotřebování substrátu se kultivace ukončí. Reaktor se vyprázdní, vsteriluje a připraví pro novou vsádku. [31]

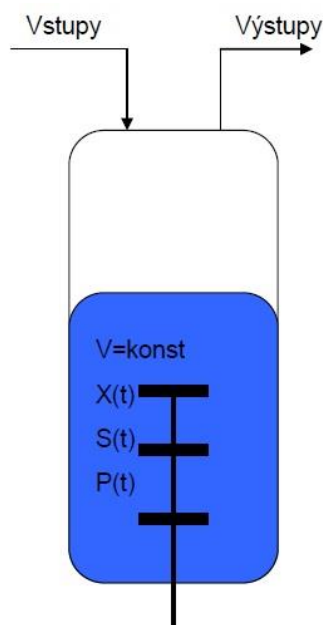
Pro optimalizaci fermentačního procesu můžeme pro velké reaktory využít tzv. scale-down. Vytvoříme ke stávajícímu průmyslovému reaktoru jeho malou laboratorní kopii, kdy použijeme stejnou kulturu i médium. Nastavíme veškeré hydrodynamické podmínky jako míchání, vzdušnění, výšku vrstvy, tak abychom simulovali veškeré procesy, ke kterým dochází během fermentace i ve velkém reaktoru. [31]

Výhody vsádkové kultivace:

- Snadná sterilizace média i reaktoru.
- Díky časovému omezení kultivace je redukováno nebezpečí kontaminací a mutací.
- Pro každou vsádku je možno nastavit jiné reakční podmínky.
- Relativně malá spotřeba média nebo inokula, což vede k úsporám především ve výzkumu.
- Řízeně je možno oddělit fázi růstu od fáze produkční, což je důležité zejména při výrobě sekundárních metabolitů. [31]

Nevýhody vsádkové kultivace:

- Vznik časových ztrát vyprazdňováním, čistěním, napouštěním a sterilizací fermentoru a vsádky.
- Další časové ztráty jsou ve formě lag-fáze (adaptace mikroorganismů na prostředí média). [31]



Obrázek 8: Schéma vsádkového způsobu. [31]

Během vsádkového procesu může docházet k řadě inhibičních procesů. Jedním z nich je inhibice substrátem, kdy jeho vysoká koncentrace působí inhibičně na rychlost růstu mikroorganismů. Každý substrát se takto musí projevit po překročení určité hodnoty koncentrace nazývané kritická. Některé substráty (např. alkoholy, mastné kyseliny) mají tuto kritickou koncentraci velmi nízkou a vzhledem k tomu nelze pro jejich utilizaci použít vsádkové kultivace. [31]

U vsádkového způsobu nedochází k odstraňování metabolitů během kultivace a toto může mít za následek inhibici dalšího růstu buněk a jejich produkce. Mnohé z konečných metabolických produktů se stávají při vysokých koncentracích inhibitory. Je tomu například u fermentační výroby alkoholu a organických kyselin. [31]

2.9 Mikroorganismy používané pro produkci bioethanolu

V dnešní době je známo mnoho mikroorganismů produkujících ethanol ze sacharidických substrátů. Stále se však hledají nejlepší producenti, kteří navíc nebudou příliš nároční na podmínky růstu a produkce. Základními požadavky na mikroorganismy jsou:

- tolerance k vyšším teplotám
- vysoké výtěžky ethanolu
- tolerance k vyšším koncentracím ethanolu
- odolnost vůči možným inhibitorům
- genetická stabilita
- produkce co nejmenšího množství jiných produktů, které by pak bylo nutné separovat. [33, 34]

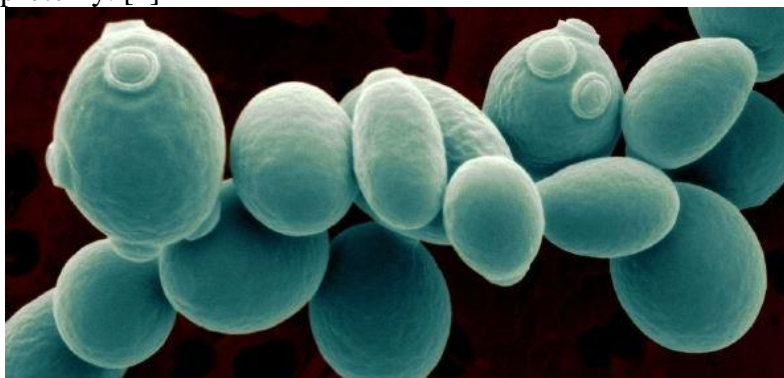
Mezi nejvíce používané mikroorganismy pro produkci bioethanolu řadíme bakterie *Zymomonas mobilis* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Je zde však mnoho dalších potenciálních producentů. Z řad bakteriálních rodů sem řadíme: *Clostridium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a další. Můžeme uvést tyto kvasinky a vláknité houby: *Kluyveromyces*, *Candida*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Pichia* a další. [35]

2.9.1 *Zymomonas mobilis*

Gramnegativní bakterie tyčinkovitého tvaru velmi často opatřena polárními bičíky. Z fyziologického hlediska je tento rod chemoheterotrofni a fakultativně anaerobní. Jsou schopny fermentovat glukózu i fruktózu a označujeme je za velmi dobré producenty ethanolu. Dalšími metabolity jsou CO_2 a také kyselina mléčná. Většinou se vyskytují jako původci kažení piva, hruškového a jablečného moštu. Patří do oddělení mezofilních mikroorganismů, čili jejich teplotní optimum je okolo 30 °C a mají poměrně široké rozmezí pH 3,5 – 7,5. U bakterií *Zymomonas mobilis* se však stále hledají způsoby pro zefektivnění produkce bioethanolu a proto patří kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* mezi dominantní producenty. [36]

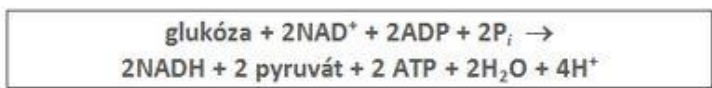
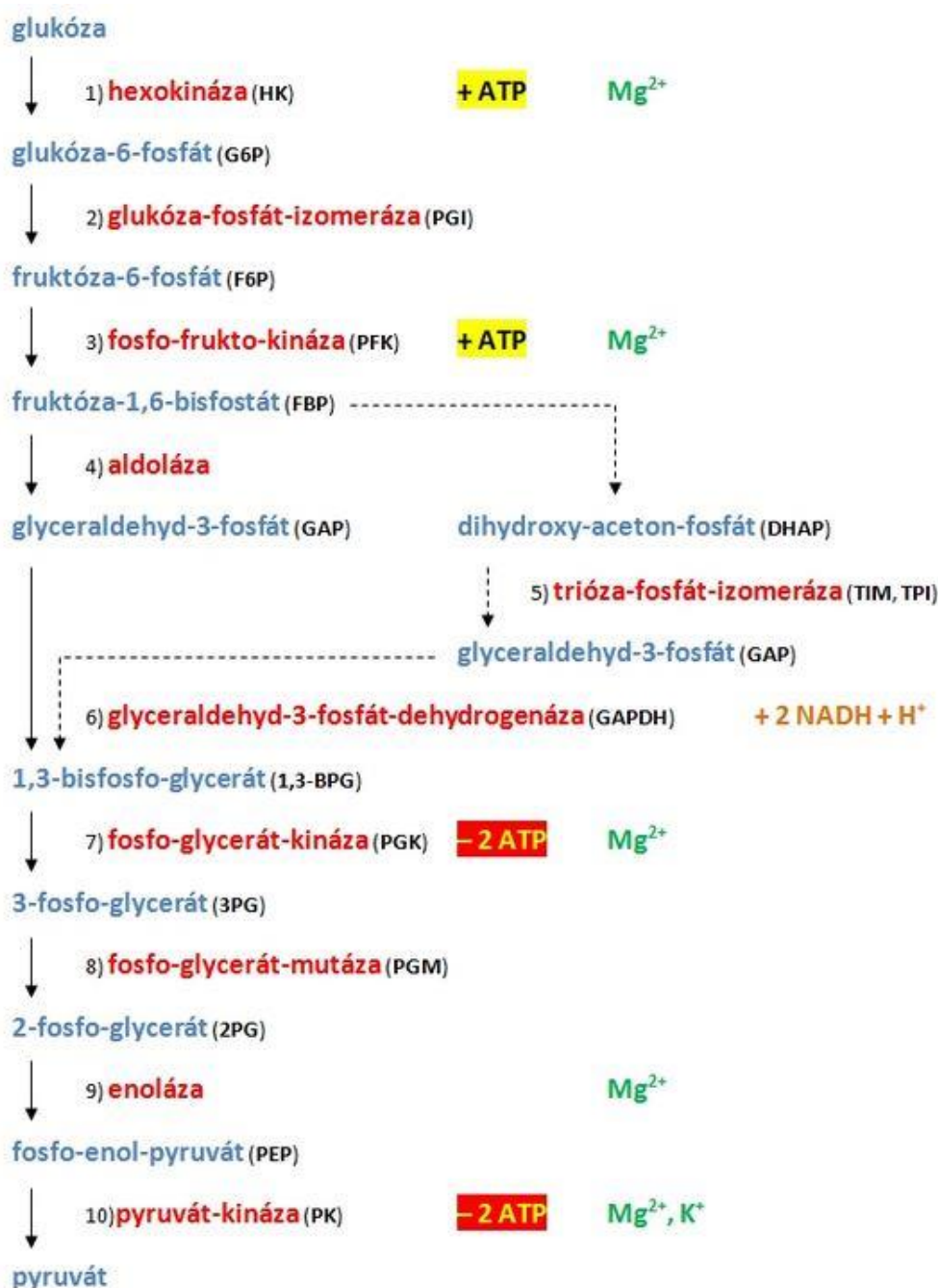
2.9.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Jsou to jednobuněčné eukaryotní organismy. Řadí se do oddělení vřeckovýtrusných hub (*Ascomycota*). Buňky *Saccharomyces cerevisiae* jsou kulaté až oválné a velké 5 – 10 μm . Buněčná stěna kvasinek je složena z polysacharidů a proteinů, přičemž jsou to především glukany a mananproteiny. [4]



Obrázek 9: Buňky *Saccharomyces cerevisiae*

U kvasinek je možné pohlavní i nepohlavní rozmnožování. Nepohlavně se rozmnožují pučením a pohlavní rozmnožování probíhá konjugací dvou haploidních buněk. Jedná se o fakultativně anaerobní a mezofilní mikroorganismus. Optimální teplota pro růst a tvorbu metabolitů je 25 – 30 °C. Zdrojem uhlíku jsou především monosacharidy, kde je nejčastěji a přednostně využívána glukóza, která je metabolizována pomocí glykolýzy a následně ethanolovým kvašením dochází k produkci ethanolu. Kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je jednou z nejprozkoumanějších kvasinek vůbec a v biotechnologiích má velmi široké využití. [4, 37]



Obrázek 10: Glykolýza [38]

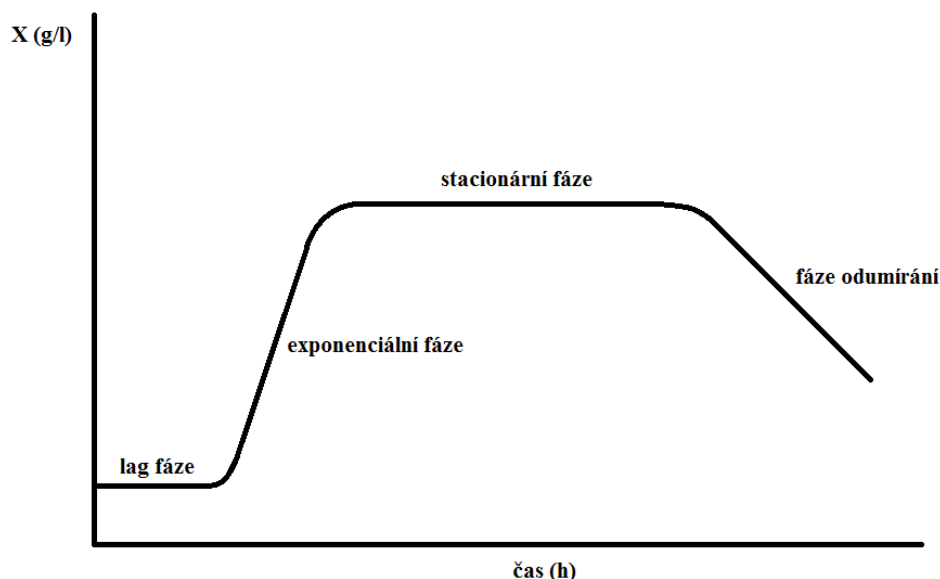
2.10 Růstová křivka

Lag fáze – bývá různě dlouhá. Vzniká po zahájení kultivace (po zaočkování vsádky inokulem). Délka je závislá na množství inokula a jeho fyziologickém stavu. Tato fáze je z průmyslového hlediska nežádoucí, protože kultura neroste a pouze se přizpůsobuje na nové podmínky.

Exponenciální fáze – pro tuto fázi je nejdůležitějším předpokladem dostatek živin obsažených v médiu. Proces by neměl být po většinu této doby limitován substrátem. Tato fáze je významná při tvorbě primárních metabolitů (např. ethanol, kyselina mléčná). Na konci této fáze dosahuje rychlost růstu buněk své maximální hodnoty.

Stacionární fáze – v této fázi je koncentrace mikroorganismů již konstantní. Výrazně je již uplatňována inhibice některou z živin (př. zdroj dusíku, uhlíku, draslíku, fosforu). Stacionární fáze má velký průmyslový význam především pro tvorbu sekundárních metabolitů.

Fáze odumírání – buňky lyzují z důvodu významného nedostatku živin a inhibičních faktorů. Z hlediska průmyslového je nežádoucí, protože se obsah buněk dostává do média a dochází tak k znečištění. [39]



Obrázek 11: Růstová křivka – vsádková kultivace

2.11 Bioethanol

Výroba bioethanolu probíhá již od roku 1975 v USA a Brazílii, kde jsou jako hlavní suroviny používány cukrová třtina a cukrová řepa. Bioethanol je přidáván do běžných automobilových benzínů v 5-10% podílu. Velkou výhodou tohoto biopaliva je nižší produkce emisních částic, snižuje produkci CO₂, CO a oxidů dusíků díky svému nižšímu oktanovému číslu oproti benzínu. Oproti benzínu má také širší limity hořlavosti, kratší dobu hoření a vyšší obsah O₂. Bioethanol je také hojně využíván jako chemická surovina. Je možné jej dehydratovat na ethylen a z něj následně získávat polyethylen, vinylchlorid a propanal. [1, 26]

Velkou snahou je vyrábět bioethanol z obnovitelných zdrojů, které však nemají primární roli jako potraviny. Proto neustále probíhají výzkumy na produkci z odpadních materiálů jako je například odpadní papír. [25]

2.11.1 Separace a odvodnění bioethanolu

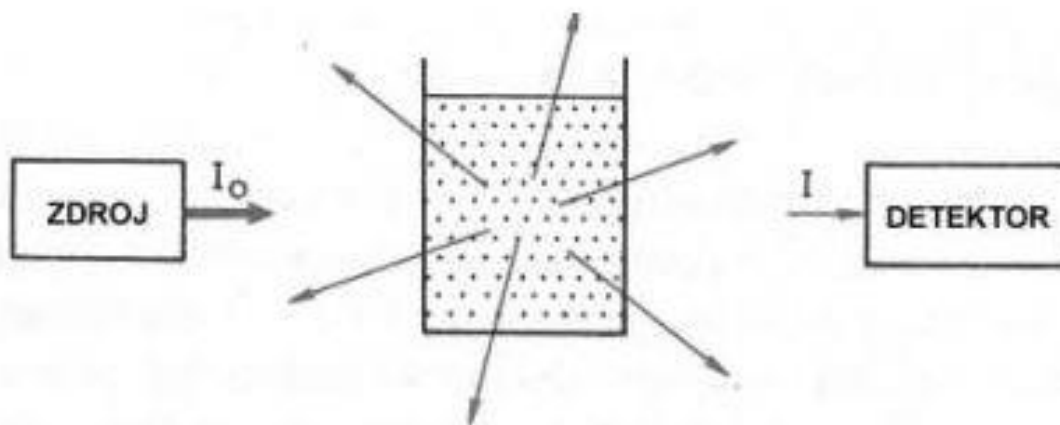
Destilací za atmosférického tlaku získáváme ethanol o koncentraci 95,5 %. Pokud jej však chceme využívat jako biopalivo je zapotřebí připravit ethanol bezvodý. Používá se

odvodňování destilací, kdy snižujeme tlak v koloně a dochází tak k posunu složení azeotropické směsi. Získáme tak takřka 100% ethanol. Bohužel finanční náročnost této metody je poměrně vysoká. Z důvodu snižování tlaku v koloně je potřeba mít kolonu s větším průměrem a silnějšími stěnami a také uzavřený chladicí okruh. Druhou možností je odvodňování tuhými látkami. Jsou to látky s hygroskopickým charakterem např. pálené vápno, chlorid vápenatý, octan sodno-draselný a další. [40]

2.12 Analytické metody

2.12.1 Turbidimetrie

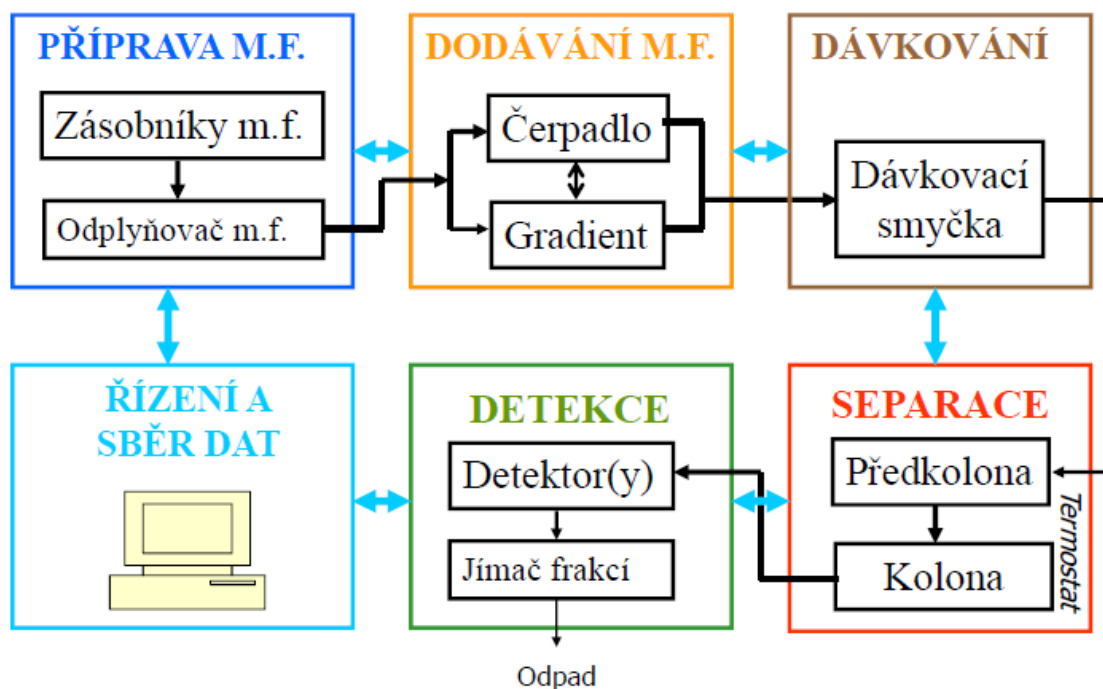
Optická metoda pro měření koloidních a zakalených roztoků. Na částicích dochází k rozptýlu záření a částečně k jeho pohlcení. Intenzita prošlého záření je vždy nižší o tyto dva jevy. Měření probíhá v přímém směru, v ose světelného paprsku zdroje. Závisí na několika faktorech, které udávají množství rozptýleného světla. Koncentrace částic ovlivňuje linearitu závislosti, avšak je zde poměrně široké rozmezí koncentrací, kdy se jedná o závislost lineární. Díky tomu lze využít Lambert-Beerova zákona. Mezi množstvím rozptýleného světla a molekulových hmotností částic existuje nepřímo úměrná závislost. Běžně se využívá vlnových délek okolo 400 – 450 nm. Z důvodu přítomnosti bílkovin ve vzorcích biologického charakteru není možno využívat kratších vlnových délek. [41]



Obrázek 12: Schéma turbidimetru, kde I_0 je intenzita záření zdroje a I je intenzita prošlého záření [42]

2.12.2 Vysokoučinná kapalinová chromatografie – HPLC

Pracuje na principu oddělování jednotlivých složek vzorku mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi, kterými jsou mobilní a stacionární fáze. HPLC umožňuje analyzovat takřka všechny organické látky ve velmi širokém rozpětí molekulových hmotností (10 – 10000). Vzorek je na kolonu dopravován pomocí mobilní fáze a při styku s náplní kolony dochází k separaci jednotlivých složek. Přítomnost jednotlivých látek v eluátu indikuje detektor a dojde k zaznamenání elučního píku. [43, 44]



Obrázek 13: Schéma kapalinového chromatografu [42]

Mobilní fáze neustále protéká kolonou a unáší analyzované vzorky. Během separace se analyt rozděluje mezi mobilní a stacionární fázi, záleží tedy na jeho afinitě k oběma fázím a tím je ovlivněna doba, kterou analyt na koloně stráví. V případě, že se po celou dobu analýzy mobilní fáze nemění, jde o tzv. izokratickou separaci. Výhodou této separace je možnost pracovat s již namíchanou a odplyněnou mobilní fází a nemusíme tedy přístroj vybavovat odplyňovacím a směšovacím zařízením. Můžeme používat i tzv. gradientovou eluci, během analýzy dochází ke změně složení mobilní fáze. Gradientová eluce se používá pro rychlejší eluci silně zadržovaných látek na koloně a získáváme tak ostřejší a užší píky oproti izokratické separaci. K správnému míchání mobilní fáze slouží eluotropní řada. Rozpouštědla v eluotropní řadě jsou řazena podle polarity. [43]

Tabulka 1: Eluotropní řada [42]

Nepolární rozpouštědla	n-hexan	1-butanol	Polární rozpouštědla
	cyklohexan	pyridin	
	chlorid uhličitý	aceton	
	benzen	propanol	
	dichlormetan	metanol	
	chloroform	formamid	
	diethylether	voda	

Stacionární fázi většinou tvoří sorbenty, které se od sebe liší polaritou. Vysoce nepolární sorbent je například aktivní uhlí a jako polární je nejčastěji používá silikagel. Silikagel se používá v systému normálních fází, kdy je stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární. [43, 44]

Základní technické vybavení tvoří čerpadlo, zařízení na dávkování vzorku, předkolona a kolona v termostatu, detektor a vyhodnocovací zařízení. [43]

Detektor je velice důležitý prvek v kapalinové chromatografii. Můžeme je rozdělit do dvou skupin, na optické a elektrochemické. Mezi optické řadíme fotometrický, fluorimetrický a refraktometrický detektor. Elektrochemické detektory jsou voltametrický a vodivostní. [44]

Refraktometrický detektor kontinuálně zaznamenává rozdíl indexu lomu mezi mobilní fází, která je v referenční cele a eluentem z kolony. Index lomu pro každou látku je uváděn vždy při dané teplotě, takže je nutné detektor temperovat. [44]

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Použité enzymy, chemikálie a přístroje

3.1.1 Enzymy

Pro enzymatickou hydrolýzu byly použity dva enzymy, které vyrábí společnost *Novozymes*®. Přesně se jednalo o produktovou řadu *Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit*.

- NS22086 – celulázový komplex: Rozkládá celulózní materiál na glukózu, celobiózu a glukooligosacharidy.
- NS22118 – β -glukosidáza: Také známá jako celobiáza, která rozkládá celobiózu na glukózu.

Tabulka 2: Klasifikace a vlastnosti enzymů [45]

enzym	aktivita ¹	hustota ² [kg.dm ⁻³]	pH	teplota [°C]	dávkování ³ % w/w (TS)
NS22086	1,000 BHU(2)/g	1,15	5,0 - 5,5	45 - 50	1 - 5 %
NS22118	250 CBU/g	1,2	2,5 - 6,5	45 - 70	0,2 - 0,6 %

¹ – BHU(2) – jednotka hydrolýzy biomasy

CBU – celobiázová jednotka

² – hodnoty hustot jsou udávány přibližně

³ – dávkování je závislé od typu suroviny, použité předúpravy suroviny a dalších podmínek zpracování, proto může být dávkování značně variabilní

3.1.2 Chemikálie

- hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát – p.a., Lachema, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- kyselina citronová monohydrát – p.a., Lachema, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
- D-glukóza – p.a., Penta, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
- kvasničný extrakt – pro bakteriologii, Roth
- síran amonný – p.a., LachNer, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
- síran hořečnatý heptahydrát – p.a., LachNer, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- dihydrogenfosforečnan draselný – p.a., LachNer, KH_2PO_4
- destilovaná voda – H_2O
- ethanol – p.a., MERCK, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$
- kyselina sírová 96% – p.a., MERCK, H_2SO_4
- hydroxid sodný – p.a., PENTA, NaOH
- kyselina octová 99,8% – p.a., LachNer, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$
- kyselina dusičná 65% – p.a., LachNer, HNO_3

3.1.3 Přístroje

- centrifuga Hettich EBA 20
- pečicí trouba Mora 524
- Ultrospec™ 10 Cell Density Meter
- termostat Memmert

- termostatovaná třepačka Heidolph® Unimax 1010
- pH metr HANNA pH 211
- běžné laboratorní sklo
- mikropipety
- minitřepačka lab dancer vario
- mixér PHILIPS HR2100/00
- sekáček Hyundai CHO 110 bílý
- HPLC
 - předkolona: Watrex Polymer IEX H-forma, 40 x 8 mm
 - kolona: Watrex Polymer IEX H-forma, 8 x 250 mm
 - auto sampler HTA 300L
 - kolonový termostat LCO 101 ECOM
 - detektor: RIDK 101
- tlakový hrnec Fagor
- sušárna UM 500 Memmert
- ultrazvuk Ultrasound
- analytické váhy Pioneer™ OHAUS
- centrifuga Eppendorf 5417 R
- elektrický vařič ETA
- mikrovlnná trouba Daewoo KOR-6L15, výkon 700 W
- muflová pec VEB ELEKTRO BAD FRANKENHAUSEN
- elektronické váhy Helago EK-300

3.2 Použitá kultura

Byla použita kultura *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6646, která pochází z České národní sbírky typových kultur v Praze. Kultura byla uchovávána v chladničce na pevném agarovém médiu v Petriho misce.

Kultura nese přesný název *Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex E.C. Hansen a kromě produkce ethanolu je možné ji využít pro mnohé další aplikace. Jedná se například o produkci ergosterolu, kyseliny nikotinové, α -glukosidázy v pivovarských odpadech a enzymu pyrofosfatázy.

3.3 Použitý substrát

Jako substrát byl použit kancelářský papír, papír ze sešitu nerecyklovaný a recyklovaný a barevné novinové letáky. Sešitové papíry byly znečištěny tužkou, propiskou a zvýrazňovačem. Veškeré papíry byly vzaty z vlastních zásob.

3.4 Příprava roztoků

3.4.1 Médium pro *Saccharomyces cerevisiae*

Inokulační a kultivační média byla připravena dle návodu dodaným zároveň s kulturou. Roztoky byly namíchány dle Tabulky 3. Následně došlo ke sterilaci v tlakovém hrnci při 120 °C po dobu 30 minut. Stejným způsobem byl připraven i pufr pro SSF, ale médium neobsahovalo glukózu.

Tabulka 3: Složení média pro *Saccharomyces cerevisiae*

destilovaná voda	250 cm ⁻³
kvasničný extrakt	1 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,25 g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O	0,125 g
KH ₂ PO ₄	0,25 g
D-glukóza	25 g

3.4.2 Roztoky pro stanovení celulózy

Ředěním 99,8% kyseliny octové byl připraven její 80% roztok. Do 1000 ml odměrné baňky bylo pipetováno 864,5 ml a zbytek doplněn destilovanou vodou po rysku. Takto připravená kyselina octová byla dále míchána s koncentrovanou kyselinou dusičnou v poměru 10:1 (1000 ml C₂H₄O₂ + 100 ml HNO₃). V další 1000 ml odměrné baňce byla připravena 72% H₂SO₄, kdy bylo pipetováno 667,7 ml koncentrované kyseliny a zbytek doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.4.3 Roztoky pro předúpravu papíru

Byly připraveny 2% w/v roztoky NaOH a H₂SO₄. Navážka hydroxidu činila 20 g a toto množství bylo rozpuštěno v 1000 ml destilované vody. Obdobným způsobem byl připraven roztok kyseliny, kdy do odměrné baňky o objemu 1000 ml bylo napipetováno 1 l 96% H₂SO₄ a zbytek doplněn destilovanou vodou po rysku.

3.4.4 Příprava pufru

Bylo naváženo 14,32 g Na₂HPO₄·12H₂O, toto množství bylo kvantitativně převedeno do odměrné baňky na 200 ml, rozpuštěno, doplněno po rysku a důkladně promícháno. Připravený roztok byl zředěn na cca 600 ml a bylo upravováno pH postupným přikapáváním kyseliny citrónové na hodnotu 4,8. Roztok s upraveným pH byl převeden do odměrné baňky na 1000 ml, baňka byla doplněna po rysku a řádně promíchána.

3.4.5 Mobilní fáze pro HPLC

Jako mobilní fáze pro HPLC analýzu glukózy a ethanolu byla zvolena 5 mM H₂SO₄, která byla připravena ředěním 279,15 µl 96% H₂SO₄ do 1000 ml odměrné baňky a ta byla doplněna po rysku deionizovanou vodou. Takto připravený roztok byl filtrován přes nitrocelulózový membránový filtr o velikosti póru 0,40 µm. Mobilní fáze zbavená všech nečistot byla umístěna v zásobní lahvi na ultrazvuk po dobu 15 min pro její důkladné odplynění.

3.4.6 Příprava kalibračních roztoků

Dle Tabulky 4 byly připraveny roztoky glukózy a ethanolu.

Tabulka 4: Kalibrační roztoky glukózy a ethanolu

	c [g·dm ⁻³]									
glukóza	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
ethanol	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

3.5 Stanovení růstové křivky *Saccharomyces cerevisiae*

Bylo připraveno 12 hodinové inokulum, ze kterého bylo odebráno 25 ml pro zaočkování 250 ml kultivačního média připraveného dle Tabulky 3. Baňka byla umístěna na temperovanou třepačku po dobu 22 h, teploty růstu se lišily z důvodu optimalizace růstu pro následnou SSF. Kultivace probíhala při teplotách, 35 °C, 40 °C, 45 °C a otáčky byly nastaveny na 150 za minutu.

Vzorky byly odebírány každou hodinu a byla měřena optická hustota. Měření bylo prováděno na přístroji Ultrospec™ 10 Cell Density Meter při vlnové délce 600 nm. Jako blank sloužilo čisté kultivační médium. Pokud naměřená optická hustota byla vyšší než 1, byly vzorek i blank ředěny.

3.6 Předúprava papíru

Pro předúpravu papíru byly zvoleny následující metody:

- fyzikální metoda – mokré a suché mletí
- kombinace fyzikálních a chemických metod
 - mikrovlnná trouba + H₂SO₄
 - mikrovlnná trouba + NaOH
 - mikrovlnná trouba + H₂SO₄ + NaOH

Kombinace fyzikální a chemické metody probíhala v mikrovlnné troubě o výkonu 700 W. Dle diplomové práce Ing. Kateřiny Andrlové bylo zvoleno 2% w/v množství substrátu. Po předúpravě v mikrovlnné troubě následovala filtrace suspenze přes Büchnerovu nálevku a filtrační koláč byl promýván destilovanou vodou až do neutrální reakce. Papír byl sušen při 70 °C v sušárně a druhý den pomlet v mixéru.

3.6.1 Mokré a suché mletí

Nastříhané proužky papíru byly rozmočeny v destilované vodě a poté i s vodou mlety v mixéru PHILIPS HR2100/00. Rozemletý papír byl následně zbaven přebytečné vody vymačkáním přes gázu a rozložen na filtrační papír. Přes noc probíhalo sušení při 70 °C v sušárně. Usušený papír byl rozemlet za použití sekáčku Hyundai CHO 110 abychom dosáhli co nejmenších částic.

3.6.2 Mikrovlnná trouba + H₂SO₄

Do 600 ml kádinky byly naváženy 3 g pomletého papíru a ten byl zalit 150 ml 2% H₂SO₄. Kádinka byla přikryta hodinovým sklíčkem a vložena do mikrovlnné trouby. Následně byla mikrovlnná trouba zapnuta na plný výkon a 8 min.

3.6.3 Mikrovlnná trouba + NaOH

Do 600 ml kádinky byly naváženy 3 g pomletého papíru a ten byl zalit 150 ml 2% NaOH. Kádinka byla přikryta hodinovým sklíčkem a vložena do mikrovlnné trouby. Následně byla mikrovlnná trouba zapnuta na plný výkon a 10 min.

3.6.4 Mikrovlnná trouba + H₂SO₄ + NaOH

Do 600 ml kádinky byly naváženy 3 g pomletého papíru a ten byl zalit 150 ml 2% H₂SO₄. Kádinka byla přikryta hodinovým sklíčkem a vložena do mikrovlnné trouby. Následně byla mikrovlnná trouba zapnuta na plný výkon a 8 min. Suspenze byla následně zfiltrována přes Büchnerovu nálevku a filtrační koláč byl promýván destilovanou vodou až do neutrální reakce. Poté byl filtrační koláč kvantitativně převeden do kádinky se 150 ml NaOH. Kádinka byla opět přikryta hodinovým sklíčkem a vložena do mikrovlnné trouby na 10 min při plném výkonu.

3.7 Analýza substrátu

3.7.1 Stanovení gramáže papíru

Z každého papíru byly vystřiženy 3 čtverce o rozměrech 10 cm a papír byl zvážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Ze získaných hodnot byla následně vypočítána hmotnost jednotlivých typů papíru.

3.7.2 Stanovení sušiny papíru

Nejdříve byl vysušen žihací kelímek v sušárně při teplotě 105 °C. Vysušený a ochlazený kelímek v exikátoru byl zvážen na analytických vahách s přesností na 0,0001 g. Do kelímku bylo naváženo 0,5 g papíru. Papír byl sušen přes noc v sušárně vyhřáté na 105 °C poté vložen do exsikátoru na vychladnutí a zvážen na analytických vahách. Sušina byla vypočtena dle vzorce:

$$\% \text{ sušina} = \frac{(w_{\text{kelímek} + \text{papír}} - w_{\text{kelímek}})}{w_{\text{papír}}} \cdot 100, \quad (1)$$

kde $w_{\text{kelímek} + \text{papír}}$ – hmotnost kelímku a papíru, $w_{\text{kelímek}}$ – hmotnost kelímku, $w_{\text{papír}}$ – hmotnost vlhkého papíru.

3.7.3 Stanovení popela

Do předem vysušených kelímků byl vložen 1 g papíru, který byl navážen na analytických vahách. Papír v kelímku byl žihán nad kahanem a po jeho úplném shoření byl kelímek vložen do muflové pece vyhřáté na 550 °C. Po 3 hodinách byl kelímek vyjmut a vložen do exikátoru. Ochlazený kelímek s popelem byl zvážen na analytických vahách. Množství popela bylo vypočítáno dle vzorce:

$$\% \text{ popel} = \frac{(w_{\text{kelímek} + \text{popel}} - w_{\text{kelímek}})}{w_{\text{papír}}} \cdot 100, \quad (2)$$

kde $w_{\text{kelímek} + \text{popel}}$ – hmotnost kelímku a popelu, $w_{\text{kelímek}}$ – hmotnost kelímku, $w_{\text{papír}}$ – hmotnost papíru.

3.7.4 Stanovení celulózy

Do 100 ml erlenmeyerovy baňky bylo na analytických vahách naváženo 0,8 g papíru s přesností na 0,0001 g. Papír byl zalit 30 ml směsí kyselin CH_3COOH a HNO_3 v poměru 10:1 (viz. 3.4.2). Následně byly všechny baňky ponechány ve vroucí lázni po dobu 60 min. Ochlazené vzorky byly filtrovány přes předem zváženou nuč s fritou o velikosti pórů S4 a dostatečně promývány ethanolem, pro snadné sušení. Sušení probíhalo při 100 °C po dobu 5 hodin. Vychlazené vzorky papíru v exsikátoru byly zváženy na analytických vahách a pomocí malého množství ethanolu kvantitativně převedeny do erlenmeyerových baněk. Krátkým povařením bylo odpařeno veškeré množství ethanolu a došlo k vytvoření suspenze papíru s 20 ml 72% H_2SO_4 , která se třepala na temperované třepačce při 30 °C a 150 otáčkách za minutu po dobu 60 min. Filtrace probíhala na nuči s označením S3 a opět byl obsah dokonale promyt ethanolem a sušen při 100 °C po dobu 5 hodin. Vysušené nuče byly vloženy do exsikátoru a poté zváženy na analytických vahách.

Množství celulózy bylo vypočítáno dle vzorce:

$$\% \text{ celulózy} = \frac{(w_{S4+papír} - w_{S4}) - (w_{S3+papír} - w_{S3})}{w_{papír}} \cdot 100, \quad (3)$$

kde $w_{S4+papír}$ – hmotnost nuče S4 s papírem, w_{S4} – hmotnost nuče S4, $w_{S3+papír}$ – hmotnost nuče S3 s papírem, w_{S3} – hmotnost nuče S3, $w_{papír}$ – hmotnost papíru.

3.8 Enzymatická hydrolýza

Hydrolýza probíhala v 16 erlenmeyerových baňkách, do kterých byly naváženy 3 g předupraveného papíru (viz. 3.6), čili pro každý typ papíru 4 předúpravy. Následně byly baňky s papírem vysterilizovány po dobu 15 min, stejně jako citran-fosforečnanový pufr o hodnotě pH 4,8. Do každé baňky bylo pipetováním přidáno 50 ml pufru, 156,5 μ l celulázového komplexu a 15 μ l β -glukosidázy, čímž vznikla 6% w/w suspenze.

Hydrolýza v erlenmeyerových baňkách probíhala 82 hodin na temperovaných třepáčkách při teplotě 40 °C a 180 rpm. Vzorek byl odebrán ihned po přípravě suspenze a poté v časových intervalech 2, 4, 8, 12, 24, 28, 34, 48, 52, 58, 72, 76, a 82 hodin.

3.9 Simultánní sacharifikace a fermentace – SSF

Simultánní sacharifikace a fermentace byla prováděna se všemi typy a úpravami papíru, pro srovnání průběhu hydrolýzy a samotné SSF. Živné médium pro *Saccharomyces cerevisiae* bylo připraveno dle Tabulky 3, avšak místo destilované vody byl použit citran-fosforečnanový pufr a neobsahovalo glukózu. Vzorky papíru pro SSF byly připraveny stejným postupem jako v případě enzymatické hydrolýzy.

Z 12 hodinového inokula *Saccharomyces cerevisiae* o optické hustotě $10,25 \pm 0,02$ s obsahem biomasy $0,35 \pm 0,01 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo pipetováno 30 ml do centrifugačních zkumavek. Po centrifugaci byl supernatant slit, sediment byl rozpuštěn ve 2 ml fyziologického roztoku a přidán do každé z baněk. Kultivace probíhala na temperované třepáčce po dobu 124 h při teplotě 40 °C a 180 rpm. První vzorek byl odebrán ihned v čase 0 a následně byly vzorky odebírány v intervalech 2, 4, 8, 12, 24, 28, 34, 48, 52, 58, 72, 76, 82, 96, 100 a 124 hodin. Vzorky byly uchovávány v mrazáku a následně rozmrazeny a dále zpracovány pro analýzu HPLC.

3.10 Stanovení množství metabolitů pomocí HPLC

Vzorky získané během hydrolýzy a SSF byly zcentrifugovány, supernatant byl přefiltrován do vialek přes nylonový filtr na stříkačku s velikostí pórů 45 μ m. V případě nutnosti byly vzorky ředěny deionizovanou vodou. Podmínky a parametry analýzy jsou uvedeny v Tabulce 5.

Tabulka 5: Podmínky a parametry analýzy HPLC

průtok	1 ml·min ⁻¹
teplota	60 °C
čas analýzy vzorku	7 min/16 min
mobilní fáze	5 mM H ₂ SO ₄
předkolona	Watrex Polymer IEX H-forma, 40 x 8 mm
kolona	Watrex Polymer IEX H-forma, 8 x 250 mm
detektor	RID

3.11 Statistické zpracování výsledků

Veškeré hodnoty výsledků byly stanoveny a změřeny třikrát. Pro vypočítání výsledné hodnoty byla použita funkce PRŮMĚR a hodnota intervalu spolehlivosti pomocí funkce CONFIDENCE. Hladina statistické významnosti byla zvolena $\alpha = 0,05$. Ke zpracování výsledku byl využit program Microsoft Excel 2013.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

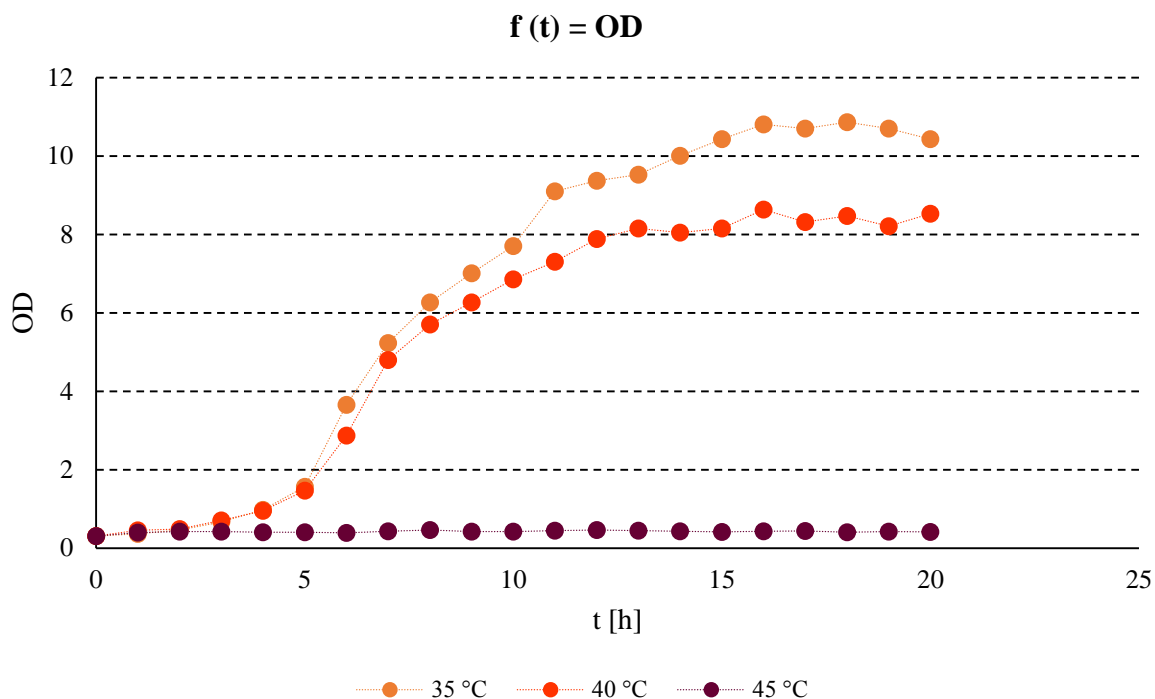
4.1 Kultivace a stanovení růstových křivek

Byl studován růst *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6646 jako závislost optické hustoty (OD). Tato závislost byla měřena turbidimetricky. Výsledky jsou shrnuty v Tabulce 6 a vyneseny do Grafu 1.

Tabulka 6: Závislost optické hustoty na čase

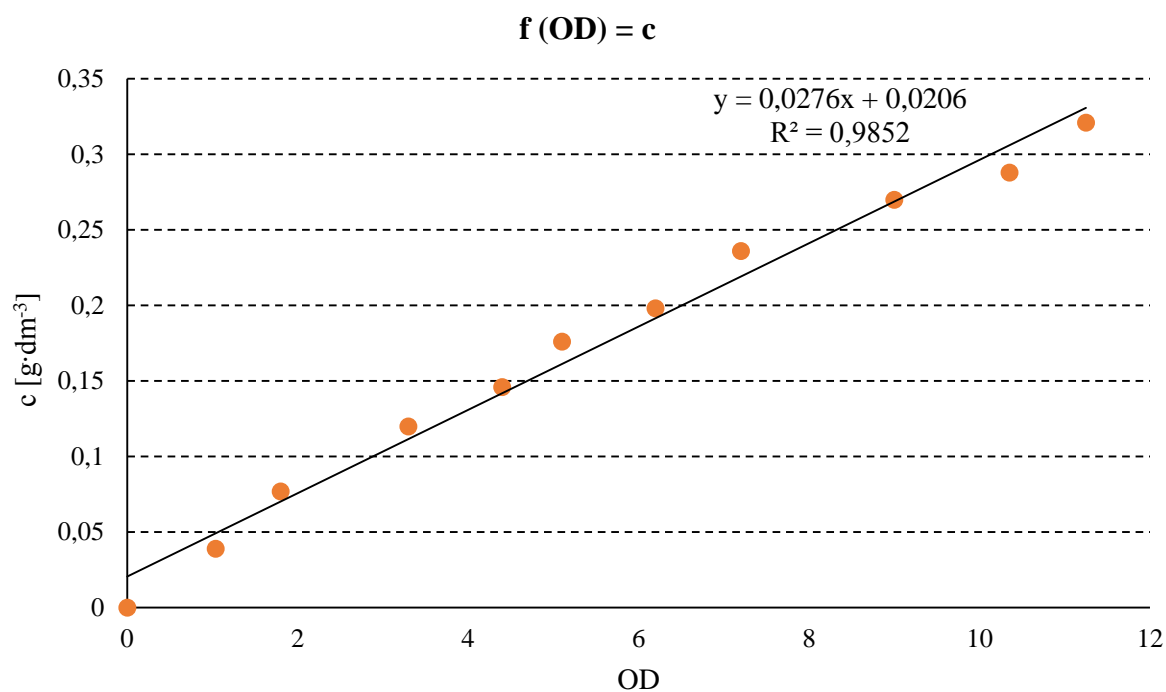
t [h]	35 °C	40 °C	45 °C
0	0,307 ± 0,009	0,303 ± 0,009	0,307 ± 0,009
1	0,367 ± 0,009	0,453 ± 0,009	0,397 ± 0,009
2	0,46 ± 0,02	0,487 ± 0,009	0,42 ± 0,02
3	0,67 ± 0,02	0,703 ± 0,009	0,423 ± 0,009
4	0,98 ± 0,02	0,95 ± 0,02	0,407 ± 0,009
5	1,567 ± 0,009	1,467 ± 0,009	0,403 ± 0,009
6	3,653 ± 0,009	2,867 ± 0,009	0,387 ± 0,009
7	5,227 ± 0,009	4,80 ± 0,02	0,43 ± 0,02
8	6,27 ± 0,02	5,707 ± 0,009	0,463 ± 0,009
9	7,013 ± 0,009	6,267 ± 0,009	0,423 ± 0,009
10	7,707 ± 0,009	6,853 ± 0,009	0,423 ± 0,009
11	9,10 ± 0,02	7,307 ± 0,009	0,443 ± 0,009
12	9,367 ± 0,009	7,887 ± 0,009	0,463 ± 0,009
13	9,527 ± 0,009	8,153 ± 0,009	0,447 ± 0,009
14	10,007 ± 0,009	8,046 ± 0,009	0,427 ± 0,009
15	10,433 ± 0,009	8,153 ± 0,009	0,417 ± 0,009
16	10,807 ± 0,009	8,633 ± 0,009	0,427 ± 0,009
17	10,70 ± 0,02	8,313 ± 0,009	0,437 ± 0,009
18	10,86 ± 0,02	8,473 ± 0,009	0,407 ± 0,009
19	10,70 ± 0,02	8,207 ± 0,009	0,423 ± 0,009
20	10,433 ± 0,009	8,527 ± 0,009	0,417 ± 0,009

Graf 1: Růstové křivky *Saccharomyces cerevisiae* při různých teplotách



Pro výpočet sušiny biomasy během kultivace byla sestrojena kalibrační křivka zobrazena na Grafu 2.

Graf 2: Kalibrační křivka sušiny biomasy při 35 °C



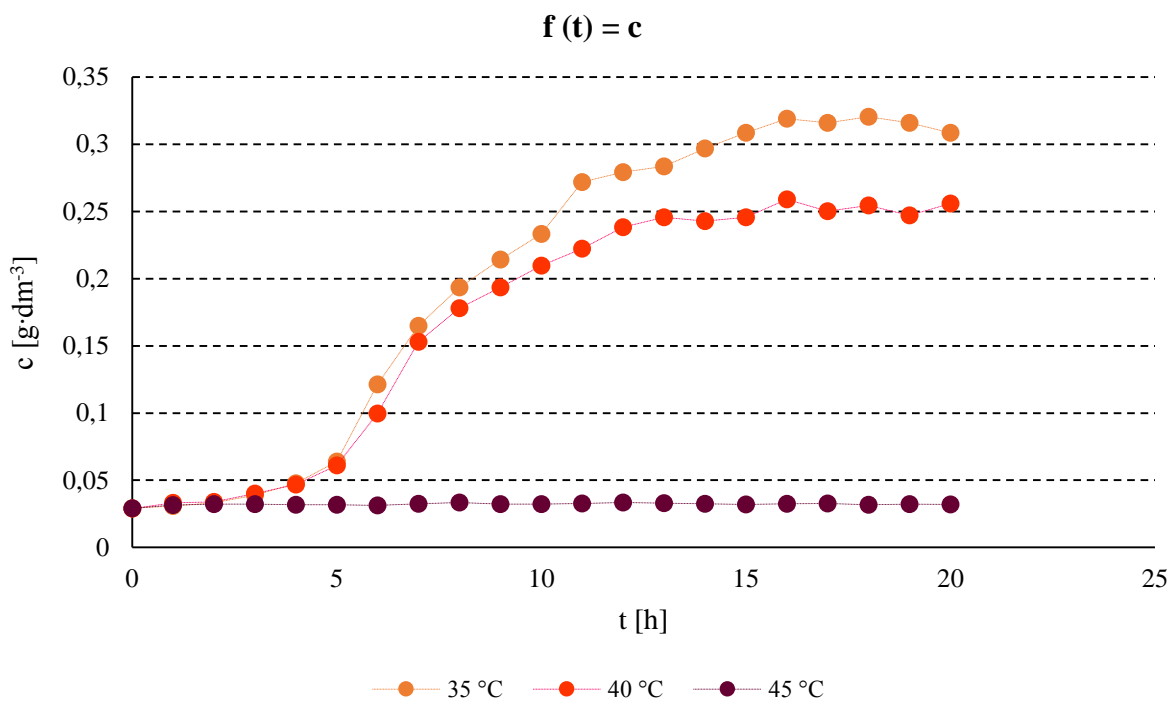
Příklad výpočtu koncentrace sušiny pro čas $t = 12$ h a teplotu 35 °C:

$$y = 0,0276x + 0,0206 \Rightarrow c = 0,0276 \cdot OD + 0,0206$$

$$c = 0,0276 \cdot 9,367 + 0,0206$$

$$c = 0,2791 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$$

Graf 3: Závislost množství sušiny biomasy na čase při různých teplotách



Z výsledků viditelných na Grafech 1 a 3 vidíme, že průběh růstu a tvorby biomasy při teplotách 35 °C a 40 °C probíhal velmi podobně, zatímco při 45 °C k růstu buněk vůbec nedocházelo. Dále je patrné, že lag fáze je vynechána a rovnou nastává exponenciální růst a to díky dostatečně předeřhřátým médiím. Jako nejvhodnější pro SSF byla zvolena teplota 40 °C jako kompromis mezi ideální teplotou pro růst kvasinek a ideální teplotou pro enzymy.

4.2 Analýza substrátu

Všechny papíry (kancelářský, nerecyklovaný sešit, recyklovaný sešit, noviny) byly podrobeny kvantitativní a kompoziční analýze. Jedná se o stanovení gramáže papíru, sušiny, popela a obsahu celulózy.

4.2.1 Stanovení gramáže papíru

Stanovení bylo provedeno dle postupu v kapitole 3.7.1. Plošná hmotnost papíru je uváděna jako hmotnost papíru o rozměrech 1 m².

Tabulka 7: Stanovení gramáže papíru

Druh papíru	Plošná hmotnost [g·m ⁻²]
Kancelářský papír	80,553 ± 0,009
Sešit nerecyklovaný	58,923 ± 0,001
Sešit recyklovaný	54,353 ± 0,002
Noviny	45,803 ± 0,002

Plošná hmotnost běžného kancelářského papíru je uváděna jako $80 \text{ g} \cdot \text{m}^{-2}$ a tato hmotnost byla zjištěna i během vážení. Dále pak vidíme, že hmotnost postupně klesá s kvalitou použitého papíru. Nejmenší hmotnost byla zjištěna u novinového papíru a je takřka poloviční oproti kancelářskému. [46]

4.2.2 Stanovení sušiny papíru

U všech typů papíru bylo provedeno stanovení sušiny dle kapitoly 3.7.2. Příklad výpočtu sušiny kancelářského papíru:

$$\% \text{ sušina} = \frac{(w_{\text{kelímek} + \text{papír}} - w_{\text{kelímek}})}{w_{\text{papír}}} \cdot 100$$

$$\% \text{ sušina} = \frac{(15,6399 - 15,1631)}{0,5004} \cdot 100$$

$$\% \text{ sušina} = 95,248 \%$$

Tabulka 8: Stanovení sušiny papíru

Druh papíru	Sušina [%]
Kancelářský papír	$95,284 \pm 0,005$
Sešit nerecyklovaný	$94,884 \pm 0,001$
Sešit recyklovaný	$94,2158 \pm 0,0009$
Noviny	$94,751 \pm 0,001$

Z tabulky je patrné, že rozdíl v obsahu sušiny není u jednotlivých druhů papíru nijak výrazný.

4.2.3 Stanovení popela

U tohoto stanovení již byl zkoumán vliv předúprav, postup stanovení je uveden v kapitole 3.7.3.

Tabulka 9: Stanovení popela papíru

Druh papíru	Způsob předúpravy	Popel [%]
Kancelářský papír	mletí	$24,8 \pm 0,1$
	kombinace mikrovln + NaOH	$19,83 \pm 0,06$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4	$8,90 \pm 0,05$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4 + NaOH	$5,208 \pm 0,075$
Sešit nerecyklovaný	mletí	$19,81 \pm 0,02$
	kombinace mikrovln + NaOH	$15,96 \pm 0,03$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4	$6,56 \pm 0,04$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4 + NaOH	$4,25 \pm 0,03$
Sešit recyklovaný	mletí	$18,627 \pm 0,004$
	kombinace mikrovln + NaOH	$12,472 \pm 0,005$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4	$5,218 \pm 0,003$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4 + NaOH	$2,319 \pm 0,005$
Noviny	mletí	$14,161 \pm 0,003$
	kombinace mikrovln + NaOH	$9,45 \pm 0,03$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4	$5,9 \pm 0,1$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4 + NaOH	$1,2 \pm 0,04$

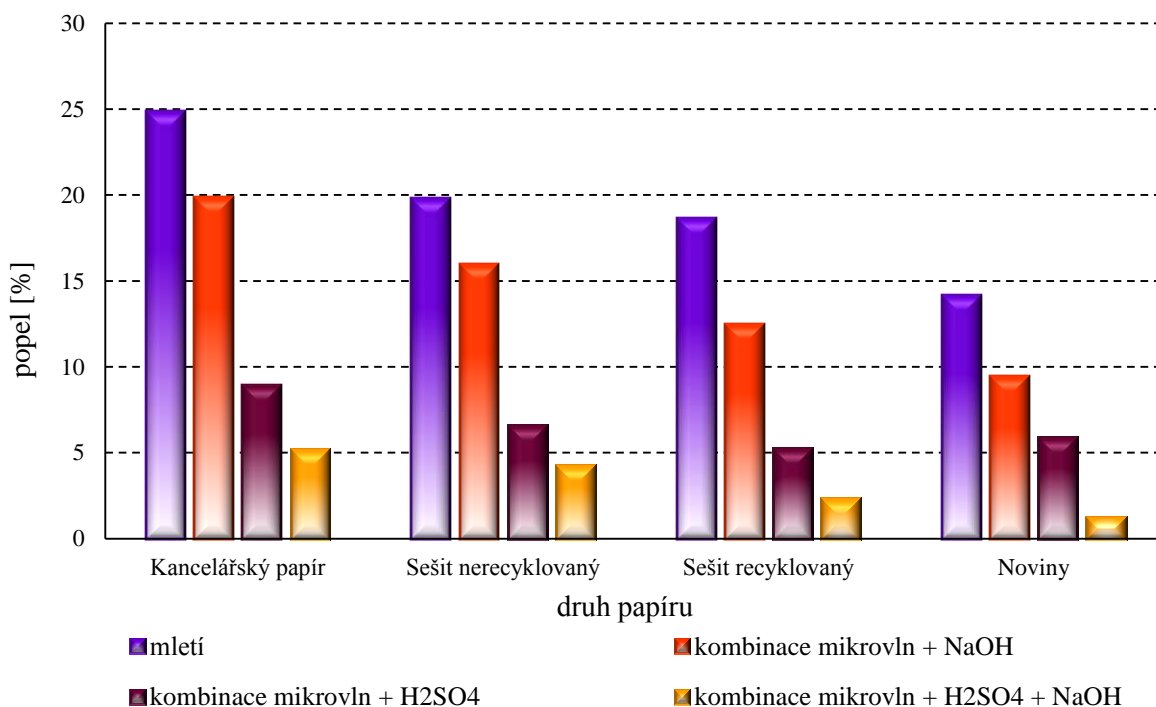
Příklad výpočtu % popela u kancelářského papíru a mletí:

$$\% \text{ popel} = \frac{(w_{\text{kelímek} + \text{popel}} - w_{\text{kelímek}})}{w_{\text{papír}}} \cdot 100$$

$$\% \text{ popel} = \frac{(15,4235 - 15,1731)}{1,008} \cdot 100$$

$$\% \text{ popel} = 24,84 \%$$

Graf 4: Závislost obsahu popela na druhu papíru a typu předúpravy



Výsledky uvedené v Tabulce 9 a na Grafu 4 nám ukazují, že výrazné rozdíly mezi papíry jsou vidět již při předúpravě mletím. Můžeme také sledovat velký vliv použitých předúprav a to převážně při použití kyseliny sírové, která přispívá k rozpouštění plnidel v papíru. Když se pro příklad podíváme na kancelářský papír, který jako nekvalitnější obsahuje nejvíce plnidel, vidíme takřka 16% úbytek popela v případě použití H₂SO₄ oproti samotnému mletí.

4.2.4 Stanovení celulózy

I v této metodě zkoumáme vliv jednotlivých předúprav na obsah celulózy ve všech druzích papíru. Postup práce je uveden v kapitole 3.7.4. Příklad výpočtu obsahu celulózy pro kancelářský papír s předúpravou mletí:

$$\% \text{ celulózy} = \frac{(w_{S4 + \text{papír}} - w_{S4}) - (w_{S3 + \text{papír}} - w_{S3})}{w_{\text{papír}}} \cdot 100$$

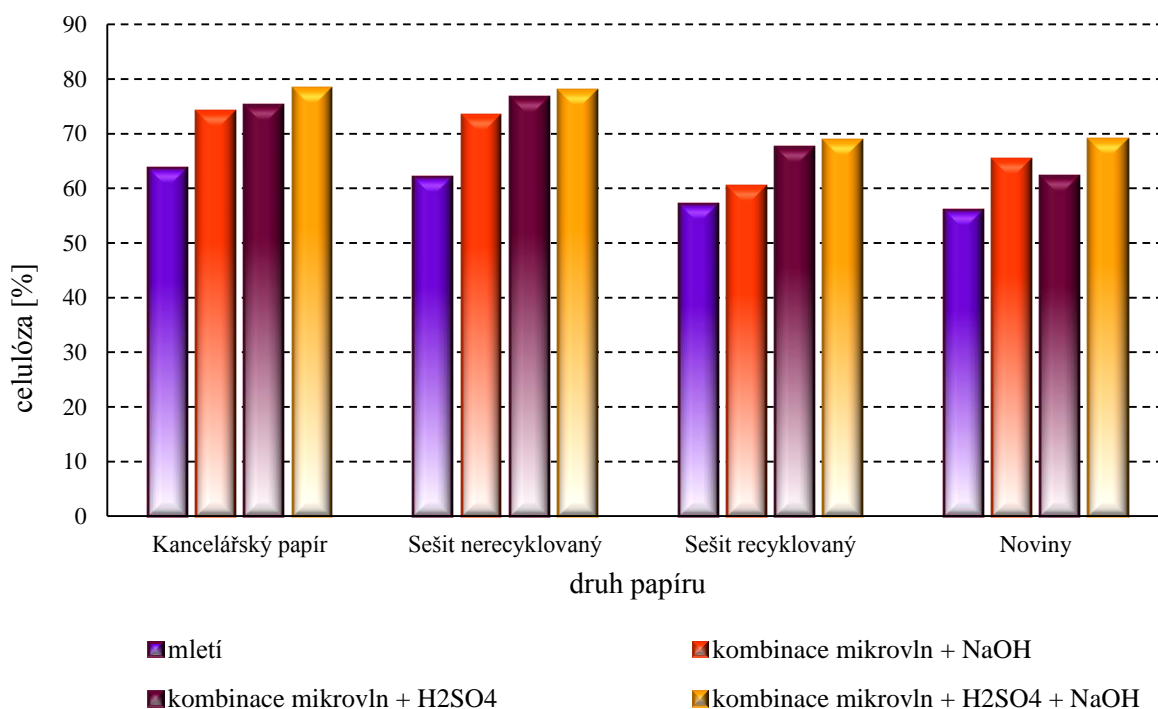
$$\% \text{ celulózy} = \frac{(36,6717 - 36,1526) - (27,5399 - 27,5343)}{0,8077} \cdot 100$$

$$\% \text{ celulózy} = 63,62 \%$$

Tabulka 10: Stanovení obsahu celulózy v papíru

Druh papíru	Způsob předúpravy	Celulóza [%]
Kancelářský papír	mletí	63,62 ± 0,02
	kombinace mikrovln + NaOH	73,98 ± 0,02
	kombinace mikrovln + H ₂ SO ₄	75,08 ± 0,02
	kombinace mikrovln + H ₂ SO ₄ + NaOH	78,21 ± 0,04
Sešit nerecyklovaný	mletí	61,97 ± 0,02
	kombinace mikrovln + NaOH	73,27 ± 0,02
	kombinace mikrovln + H ₂ SO ₄	76,54 ± 0,05
	kombinace mikrovln + H ₂ SO ₄ + NaOH	77,90 ± 0,03
Sešit recyklovaný	mletí	57,11 ± 0,04
	kombinace mikrovln + NaOH	60,30 ± 0,07
	kombinace mikrovln + H ₂ SO ₄	66,15 ± 0,07
	kombinace mikrovln + H ₂ SO ₄ + NaOH	69,92 ± 0,02
Noviny	mletí	55,86 ± 0,04
	kombinace mikrovln + NaOH	65,34 ± 0,02
	kombinace mikrovln + H ₂ SO ₄	62,21 ± 0,09
	kombinace mikrovln + H ₂ SO ₄ + NaOH	68,82 ± 0,07

Graf 5: Závislost obsahu celulózy na druhu papíru a typu předúpravy



Z grafu a tabulky je patrné, že typ předúpravy má vliv na zpřístupnění celulózy. Dále můžeme vidět, že obsah celulózy klesá s kvalitou papíru. Největší obsah celulózy byl zjištěn u kancelářského papíru s předúpravou kombinace mikrovln + H₂SO₄ + NaOH, a to 78,21 %.

Nejmenší obsah celulózy byl u všech papírů při předúpravě mletím. Tyto výsledky nám potvrzují funkci použití chemických předúprav, které jsou uvedeny v teoretické části v kapitole 2.5.3.

4.3 HPLC analýza

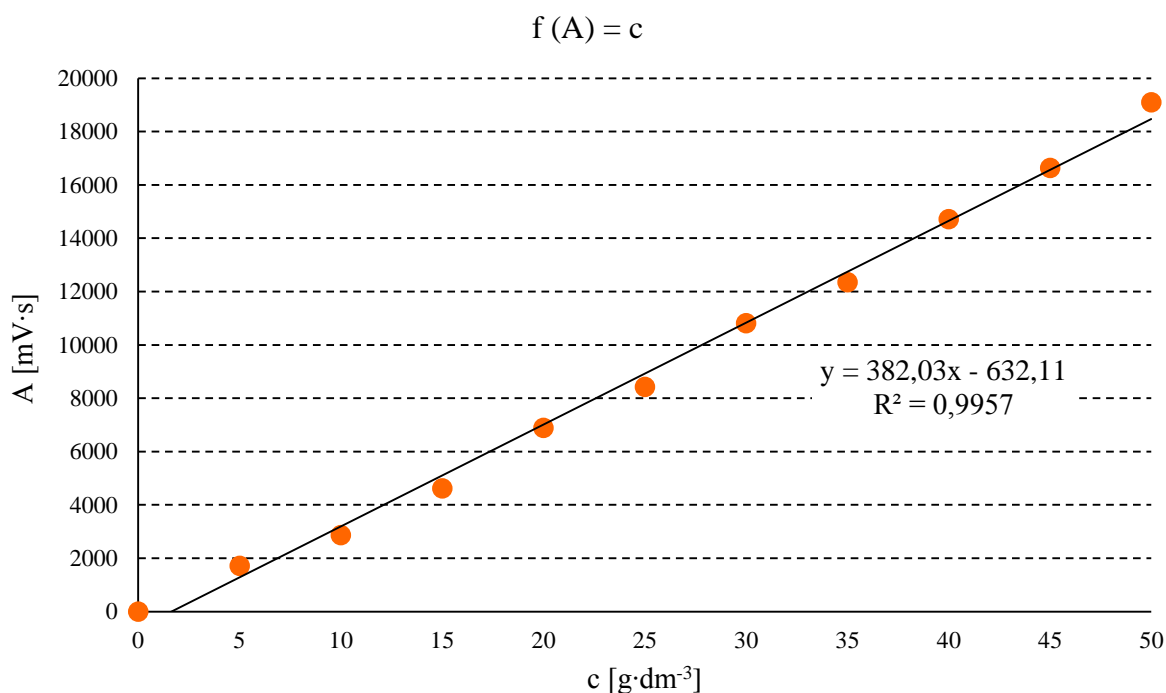
4.3.1 Kalibrační křivky

Ředěním standardních roztoků byly připraveny roztoky pro kalibrační křivky glukózy a ethanolu. Roztoky byly namíchány dle Tabulky 4, která je uvedena v kapitole 3.4.6.

Tabulka 11: Kalibrační řada – glukóza

c [g·dm ⁻³]	A [mV·s]
0	0
5	1711 ± 12
10	2887 ± 19
15	4614 ± 74
20	6885 ± 12
25	8425 ± 19
30	10811 ± 112
35	12346 ± 24
40	14718 ± 126
45	16635 ± 125
50	19094 ± 73

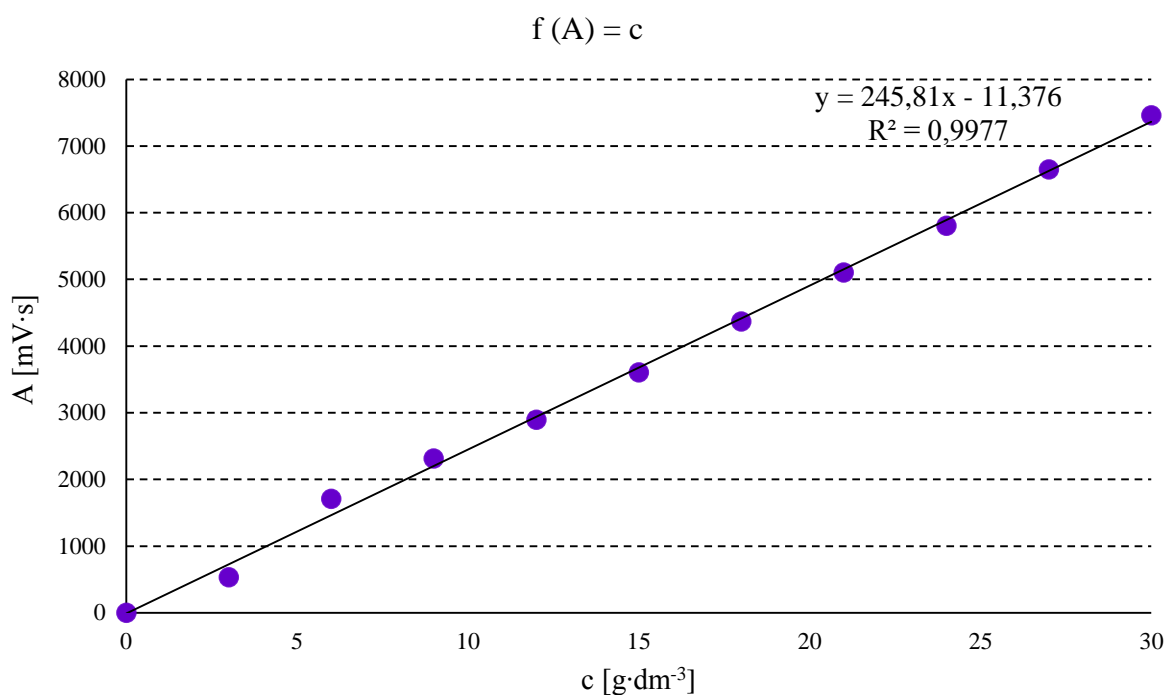
Graf 6: Kalibrační křivka – glukóza



Tabulka 12: Kalibrační řada – ethanol

c [g·dm ⁻³]	A [mV·s]
0	0
3	532 ± 28
6	1707 ± 74
9	2311 ± 57
12	2893 ± 47
15	3605 ± 78
18	4369 ± 37
21	5102 ± 13
24	5806 ± 22
27	6647 ± 12
30	7460 ± 41

Graf 7: Kalibrační křivka – ethanol



Pomocí regresních rovnic získaných z Grafu 6 a Grafu 7 bylo dále vypočítáno množství glukózy při hydrolýze a SSF a množství ethanolu při SSF.

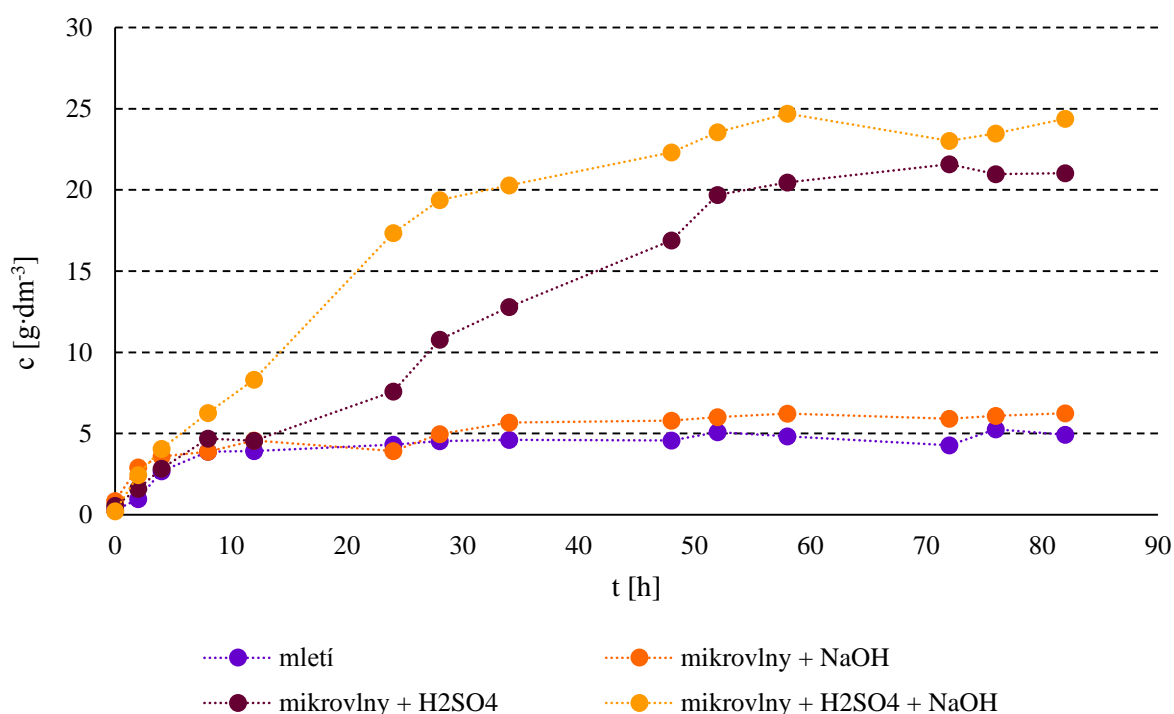
4.3.2 Enzymatická hydrolýza

Při enzymatické hydrolýze byl sledován zisk glukózy z jednotlivých druhů papírů. Zároveň byl sledován vliv předúpravy na množství glukózy. Veškeré výsledky jsou uvedeny v tabulkách a graficky znázorněny pomocí grafů.

Tabulka 13: Průběh tvorby glukózy z kancelářského papíru

	c [g·dm ⁻³]			
t [h]	mletí	mikrovlny + NaOH	mikrovlny + H ₂ SO ₄	mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH
0	0,27 ± 0,02	0,85 ± 0,05	0,54 ± 0,07	0,22 ± 0,03
2	0,97 ± 0,08	2,92 ± 0,06	1,59 ± 0,05	2,45 ± 0,04
4	2,68 ± 0,03	3,58 ± 0,02	2,83 ± 0,03	4,06 ± 0,02
8	3,879 ± 0,005	3,89 ± 0,08	4,689 ± 0,008	6,27 ± 0,04
12	3,925 ± 0,007	4,58 ± 0,04	4,547 ± 0,003	8,324 ± 0,005
24	4,321 ± 0,005	3,92 ± 0,06	7,58 ± 0,04	17,35 ± 0,04
28	4,528 ± 0,004	4,961 ± 0,007	10,78 ± 0,06	19,37 ± 0,08
34	4,62 ± 0,02	5,68 ± 0,08	12,79 ± 0,08	20,285 ± 0,006
48	4,58 ± 0,04	5,80 ± 0,09	16,89 ± 0,07	22,314 ± 0,004
52	5,09 ± 0,08	6,01 ± 0,07	19,687 ± 0,005	23,55 ± 0,01
58	4,83 ± 0,02	6,235 ± 0,009	20,47 ± 0,04	24,69 ± 0,03
72	4,271 ± 0,009	5,92 ± 0,04	21,58 ± 0,02	23,02 ± 0,07
76	5,26 ± 0,08	6,08 ± 0,07	20,98 ± 0,06	23,48 ± 0,01
82	4,92 ± 0,05	6,25 ± 0,08	21,032 ± 0,009	24,39 ± 0,08

Graf 8: Závislost tvorby glukózy na čase z kancelářského papíru

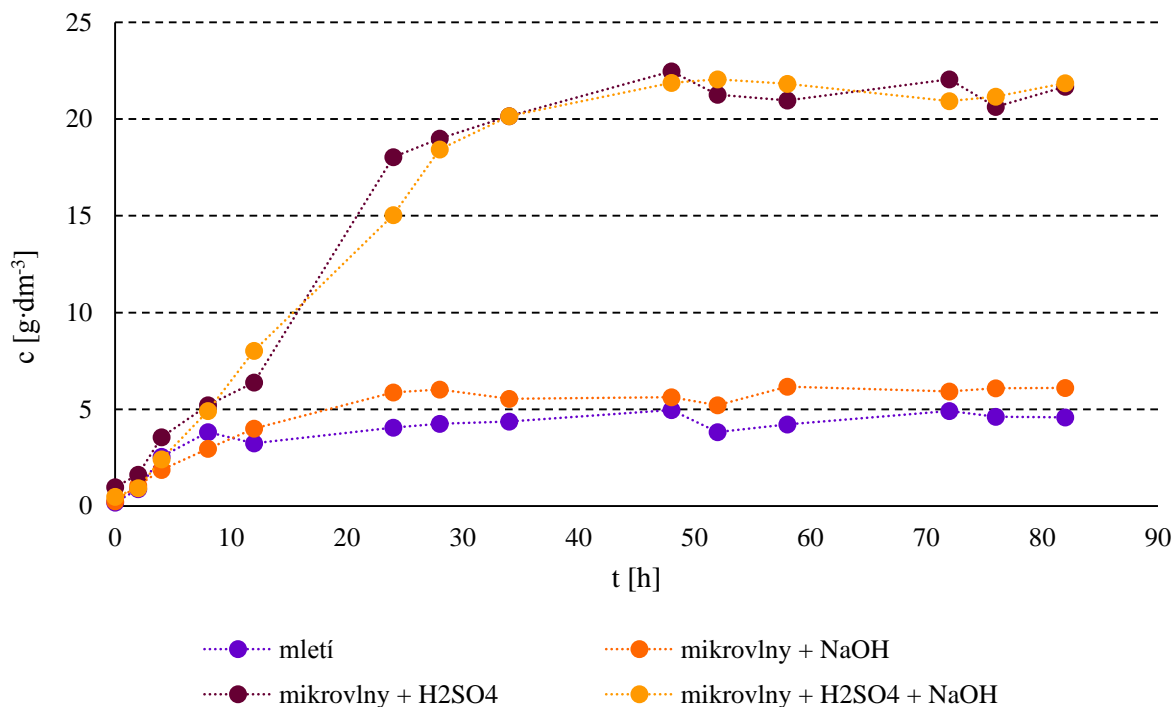


U kancelářského papíru byla zjištěna nejvyšší koncentrace při použití předúpravy kombinace mikrovln + H₂SO₄ + NaOH a to $24,39 \pm 0,08$ g·dm⁻³. Nejnižší koncentrace glukózy byla u předúpravy mletím. Velmi podobného výsledku bylo dosaženo i v případě mikrovln + NaOH. U kancelářského papíru, který je hodně kvalitní a celulóza v něm je těžko dostupná jsou první dvě úpravy nedostatečné. Toto bylo možné pozorovat i v průběhu samotné hydrolýzy, kdy takřka nedocházelo ke ztekucování papíru.

Tabulka 14: Průběh tvorby glukózy z nerecyklovaného sešitu

	c [g·dm ⁻³]			
t [h]	mletí	mikrovlny + NaOH	mikrovlny + H ₂ SO ₄	mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH
0	0,19 ± 0,08	0,25 ± 0,04	0,98 ± 0,08	0,48 ± 0,02
2	0,88 ± 0,04	1,06 ± 0,02	1,62 ± 0,03	0,921 ± 0,004
4	2,541 ± 0,002	1,87 ± 0,07	3,56 ± 0,04	2,41 ± 0,01
8	3,82 ± 0,04	2,97 ± 0,04	5,22 ± 0,01	4,92 ± 0,08
12	3,247 ± 0,01	4,012 ± 0,005	6,39 ± 0,04	8,03 ± 0,04
24	4,05 ± 0,07	5,87 ± 0,04	18,04 ± 0,07	15,035 ± 0,002
28	4,25 ± 0,02	6,02 ± 0,07	19,002 ± 0,006	18,44 ± 0,08
34	4,37 ± 0,01	5,541 ± 0,008	20,15 ± 0,01	20,15 ± 0,07
48	4,97 ± 0,03	5,63 ± 0,07	22,47 ± 0,04	21,87 ± 0,03
52	3,83 ± 0,04	5,214 ± 0,03	21,26 ± 0,02	22,06 ± 0,04
58	4,224 ± 0,004	6,18 ± 0,01	20,97 ± 0,01	21,82 ± 0,06
72	4,91 ± 0,05	5,93 ± 0,02	22,055 ± 0,004	20,934 ± 0,005
76	4,62 ± 0,02	6,084 ± 0,007	20,64 ± 0,02	21,16 ± 0,04
82	4,59 ± 0,07	6,11 ± 0,05	21,67 ± 0,04	21,86 ± 0,04

Graf 9: Závislost tvorby glukózy na čase z nerecyklovaného sešitu

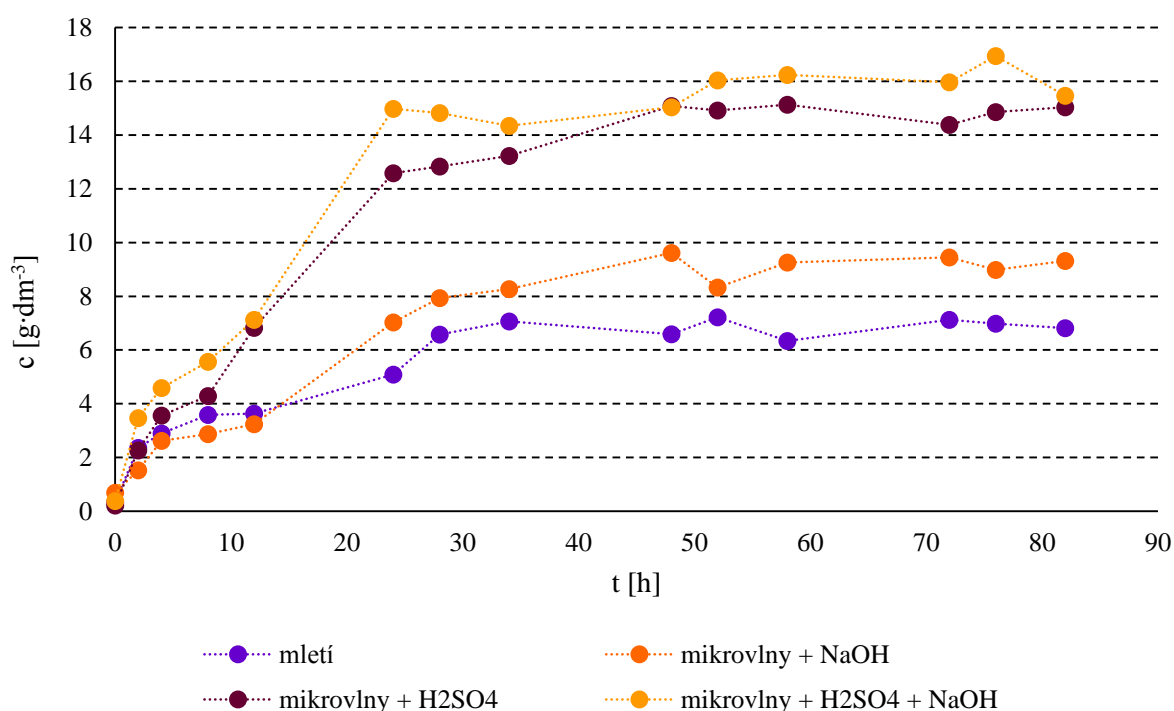


V případě nerecyklovaného sešitu byla získána nevyšší koncentrace glukózy pomocí předúpravy mikrovln a H₂SO₄. Nicméně předúprava mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH vykázala jen o 0,11 g·dm⁻³ nižší koncentraci glukózy, můžeme tedy říct, že obě předúpravy byly takřka stejně účinné. Nejnižší koncentrace byla stejně jako u kancelářského papíru při použití předúpravy mletí.

Tabulka 15: Průběh tvorby glukózy z recyklovaného sešitu

t [h]	c [g·dm ⁻³]			
	mletí	mikrovlny + NaOH	mikrovlny + H ₂ SO ₄	mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH
0	0,34 ± 0,02	0,69 ± 0,04	0,21 ± 0,01	0,38 ± 0,01
2	2,36 ± 0,07	1,53 ± 0,05	2,27 ± 0,05	3,47 ± 0,08
4	2,90 ± 0,02	2,62 ± 0,02	3,56 ± 0,02	4,59 ± 0,03
8	3,587 ± 0,003	2,87 ± 0,04	4,285 ± 0,006	5,56 ± 0,08
12	3,64 ± 0,06	3,24 ± 0,05	6,83 ± 0,05	7,12 ± 0,04
24	5,09 ± 0,03	7,035 ± 0,006	12,58 ± 0,04	14,972 ± 0,006
28	6,58 ± 0,02	7,93 ± 0,02	12,832 ± 0,08	14,82 ± 0,04
34	7,06 ± 0,01	8,27 ± 0,04	13,22 ± 0,03	14,341 ± 0,004
48	6,59 ± 0,05	9,62 ± 0,03	15,08 ± 0,01	15,033 ± 0,001
52	7,225 ± 0,002	8,33 ± 0,02	14,92 ± 0,03	16,04 ± 0,07
58	6,34 ± 0,08	9,26 ± 0,06	15,13 ± 0,04	16,24 ± 0,04
72	7,12 ± 0,07	9,445 ± 0,003	14,38 ± 0,02	15,97 ± 0,03
76	6,978 ± 0,004	8,98 ± 0,01	14,852 ± 0,007	16,941 ± 0,003
82	6,81 ± 0,06	9,312 ± 0,009	15,04 ± 0,05	15,46 ± 0,04

Graf 10: Závislost tvorby glukózy na čase z recyklovaného sešitu

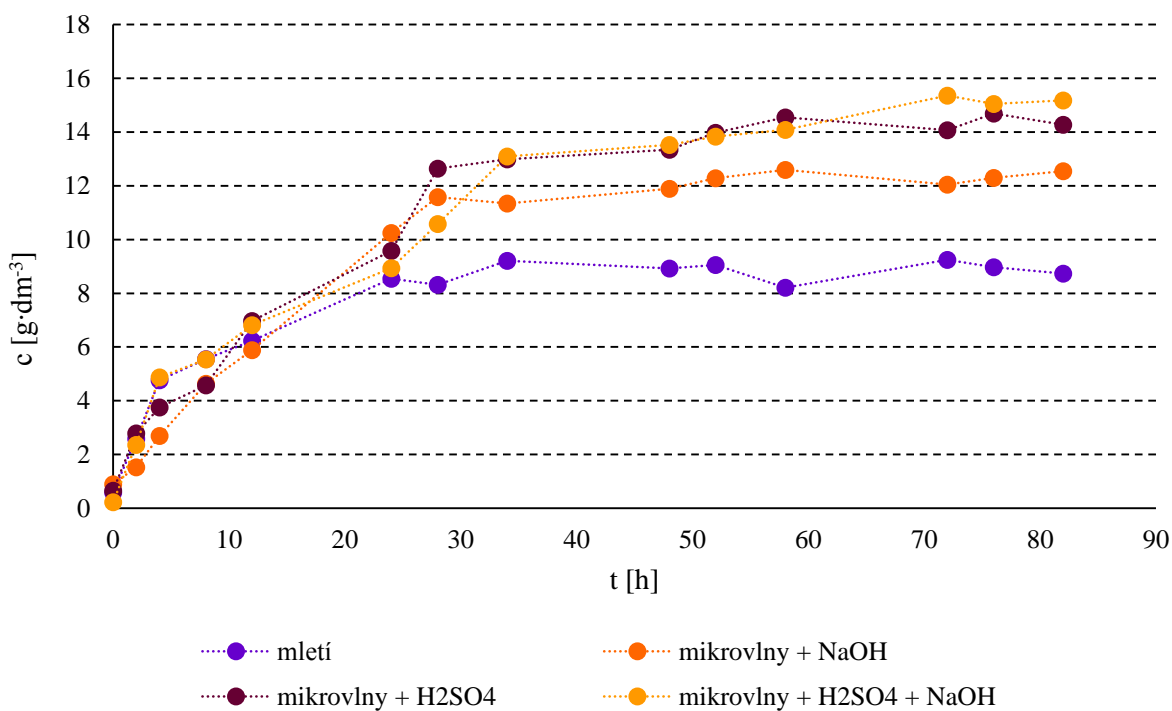


U recyklovaného sešitu pozorujeme nárůst zisku glukózy u prvních dvou předúprav. I přes skutečnost, že obsah celulózy byl menší než u nerecyklovaného papíru, je celulóza dostupnější pro enzymy již při použití mletí. Nejvyšší obsah glukózy byl zjištěn u předúpravy mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH a to $16,941 \pm 0,003$ g·dm⁻³. Toto je přibližně o $7,5$ g·dm⁻³ méně než u kancelářského papíru upraveného pomocí stejné předúpravy.

Tabulka 16: Průběh tvorby glukózy z novin

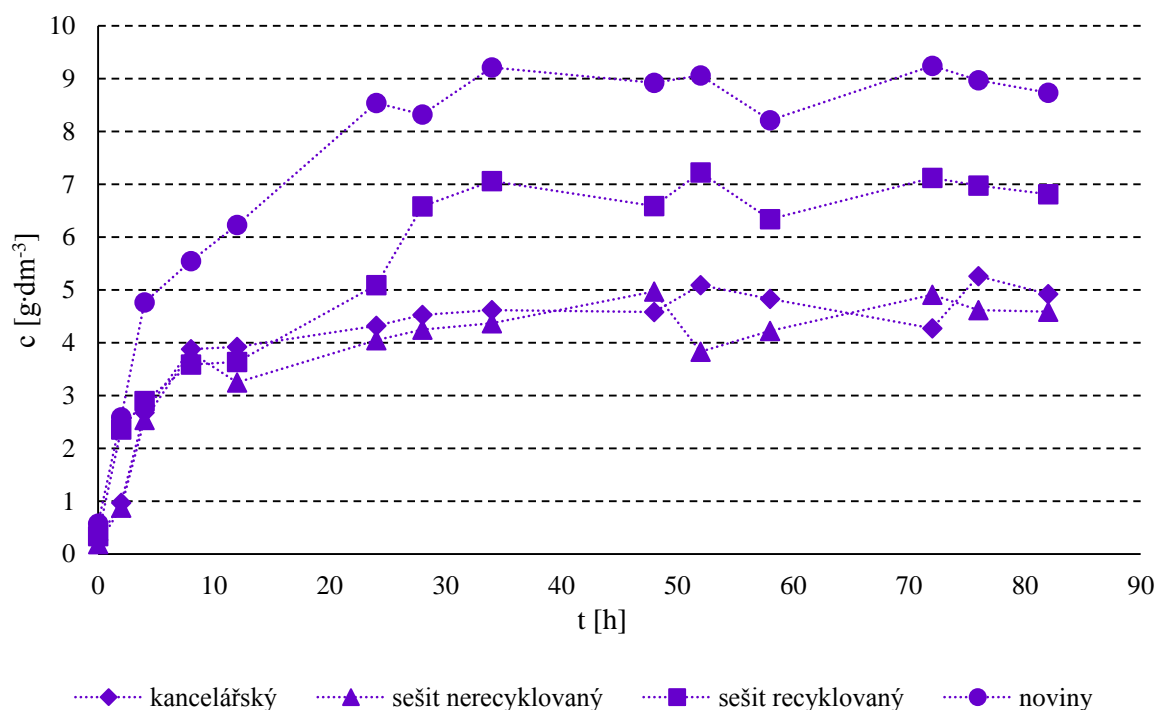
	c [g·dm ⁻³]			
t [h]	mletí	mikrovlny + NaOH	mikrovlny + H ₂ SO ₄	mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH
0	0,58 ± 0,06	0,89 ± 0,03	0,66 ± 0,03	0,23 ± 0,05
2	2,59 ± 0,04	1,52 ± 0,04	2,794 ± 0,004	2,365 ± 0,004
4	4,762 ± 0,002	2,69 ± 0,08	3,752 ± 0,003	4,87 ± 0,02
8	5,547 ± 0,003	4,63 ± 0,04	4,58 ± 0,06	5,54 ± 0,03
12	6,23 ± 0,02	5,88 ± 0,01	6,97 ± 0,03	6,82 ± 0,01
24	8,54 ± 0,04	10,244 ± 0,006	9,58 ± 0,02	8,93 ± 0,02
28	8,32 ± 0,07	11,58 ± 0,01	12,64 ± 0,03	10,58 ± 0,04
34	9,21 ± 0,03	11,34 ± 0,02	12,982 ± 0,004	13,089 ± 0,002
48	8,92 ± 0,02	11,89 ± 0,02	13,338 ± 0,005	13,52 ± 0,05
52	9,06 ± 0,01	12,28 ± 0,07	13,98 ± 0,04	13,83 ± 0,02
58	8,21 ± 0,03	12,59 ± 0,04	14,55 ± 0,02	14,08 ± 0,03
72	9,24 ± 0,05	12,05 ± 0,02	14,065 ± 0,002	15,36 ± 0,04
76	8,97 ± 0,03	12,291 ± 0,001	14,69 ± 0,04	15,05 ± 0,08
82	8,73 ± 0,01	12,55 ± 0,05	14,27 ± 0,02	15,18 ± 0,02

Graf 11: Závislost tvorby glukózy na čase z novin



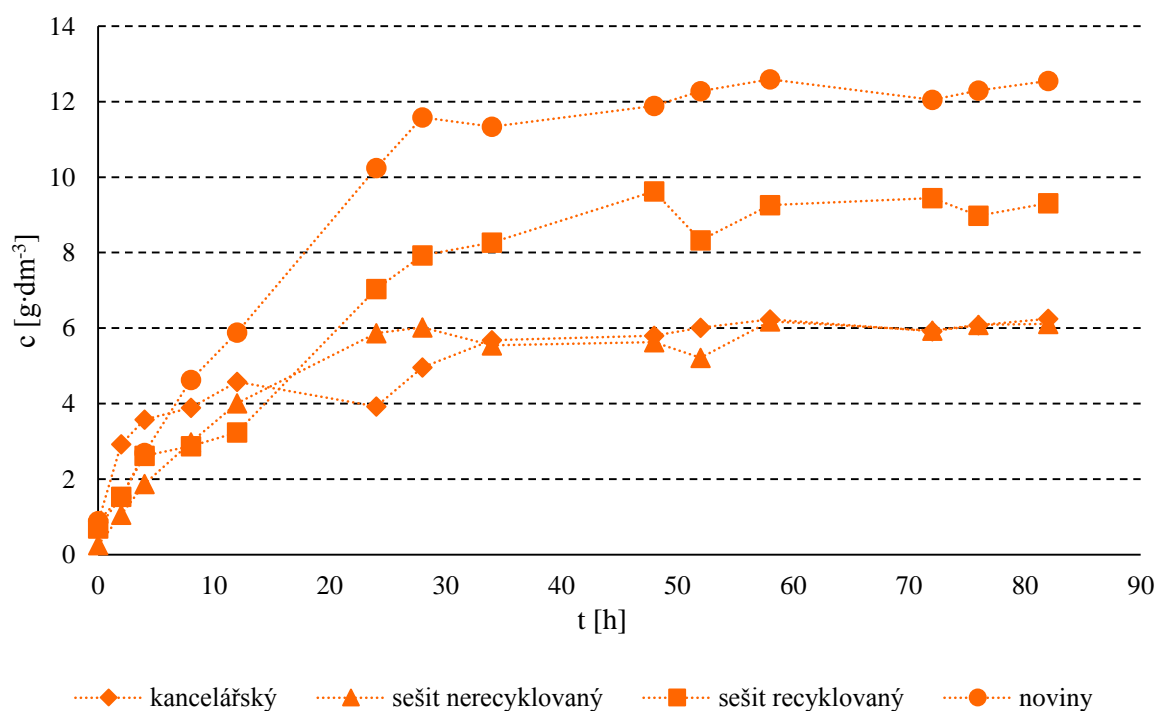
U novin pozorujeme, že glukóza se ve větším množství tvoří už u úpravy mletím. Navíc zde nejsou takové rozdíly jako u nerecyklovaných papírů. Nejvyšší koncentrace byla dosažena pomocí předúpravy mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH a to 15,36 ± 0,04 g·dm⁻³. Koncentrace získané glukózy nejsou tak vysoké jako u nerecyklovaných papírů, jelikož noviny obsahují méně celulózy.

Graf 12: Závislost tvorby glukózy ze všech papírů s předúpravou mletí



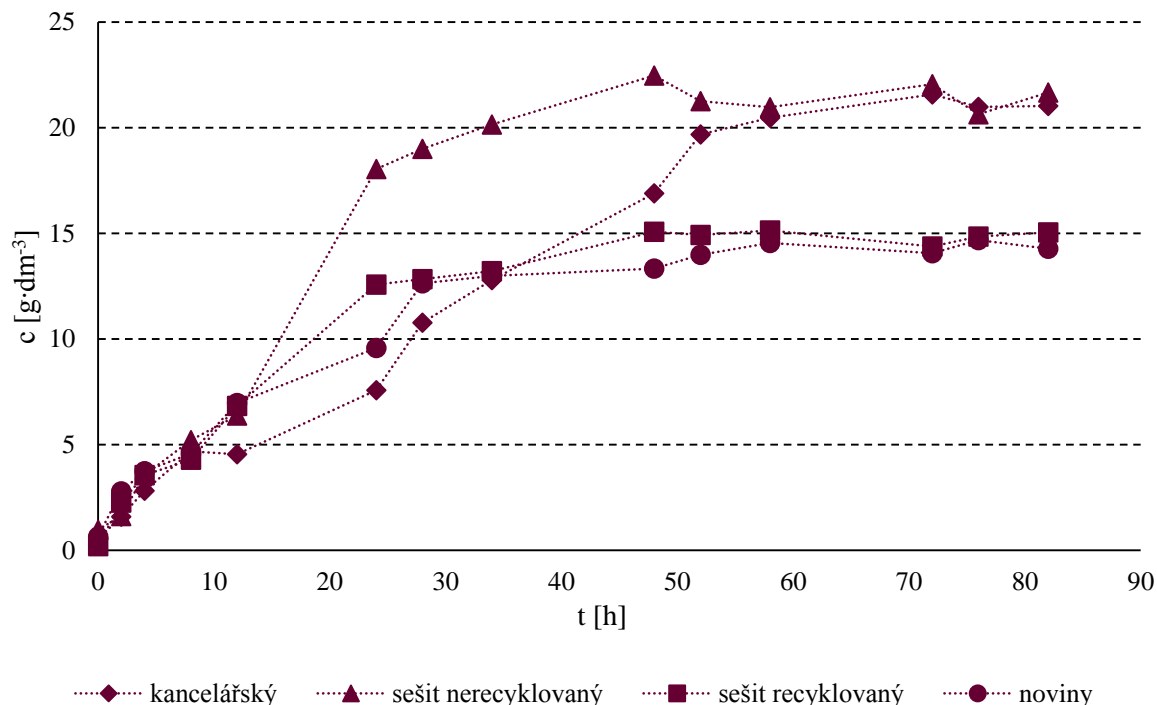
Předúprava mletí byla nejúčinnější v případě novin a recyklovaného sešitu. U kancelářského papíru a nerecyklovaného sešitu pozorujeme jen velmi malé koncentrace glukózy. Konec hydrolýzy pozorujeme novin a recyklovaného sešitu okolo 34. hodiny. Kdežto v případě kancelářského papíru a nerecyklovaného sešitu vidíme konec až okolo 50. hodiny.

Graf 13: Závislost tvorby glukózy ze všech papírů s předúpravou mikrovlny + NaOH



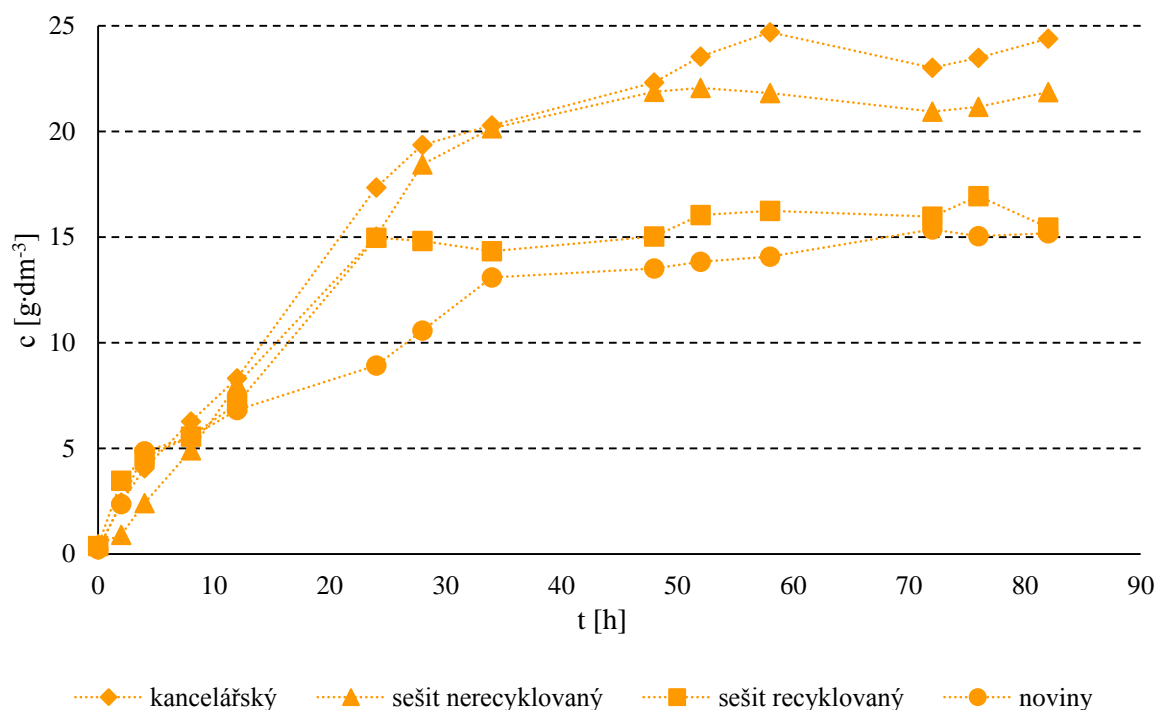
U této předúpravy opět získáváme nevyšší koncentraci z novin a to $12,59 \pm 0,04 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stejně jako u mletí jsou koncentrace glukózy z kancelářského papíru a nerecyklovaného sešitu velmi malé a takřka totožné. U všech papírů dochází ke konci hydrolýzy až po 50. hodině.

Graf 14: Závislost tvorby glukózy ze všech papírů s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4



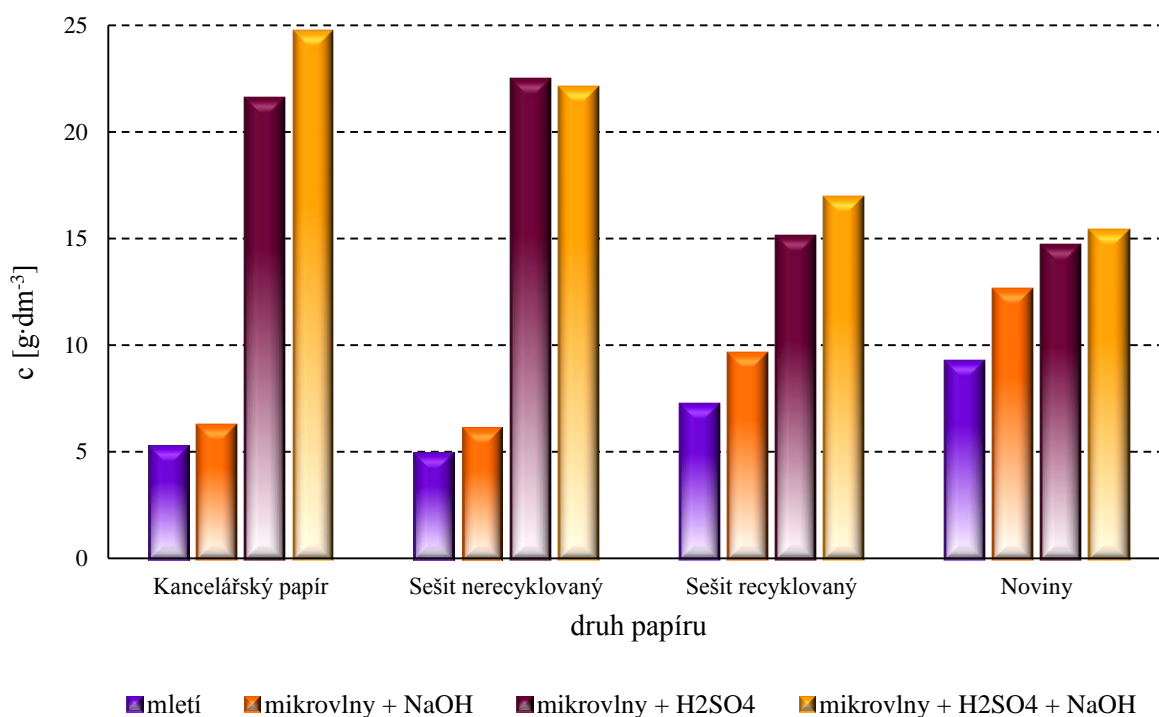
V případě předúpravy mikrovlny + H_2SO_4 můžeme pozorovat změnu v tvorbě glukózy. Nejvyšší koncentrace byla dosažena u nerecyklovaného sešitu a kancelářského papíru. Použití kyseliny sírové nám zajišťuje vyšší zisk glukózy a je tedy účinnější než hydroxid. Dochází k lepšímu rozpouštění hemicelulózy a ligninu a tím ke zpřístupnění celulózy pro enzymy. Nerecyklovaný sešit je méně kvalitní než kancelářský papír a obsahuje méně plnidel, proto byla jeho hydrolýza efektivnější. Konec hydrolýzy nerecyklovaného papíru pozorujeme kolem 50. hodiny, stejně tak i u recyklovaného sešitu a novin. U kancelářského papíru nastává konec hydrolýzy až po 70 hodinách.

Graf 15: Závislost tvorby glukózy ze všech papírů s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH



Předúprava mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH byla celkově nejefektivnější u všech druhů papíru. Nejvyšší množství glukózy $24,69 \pm 0,03 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ bylo získáno u kancelářského papíru. Použití této předúpravy zajišťuje dostupnost celulózy i u kvalitních papírů a tím vyšší zisk glukózy. Konec hydrolýzy u kancelářského papíru je okolo 58. hodiny, v případě recyklovaného sešitu je to 24. hodině a u nerecyklovaného sešitu a novin okolo 50. hodiny.

Graf 16: Celkové srovnání konečných koncentrací glukózy



Srovnávací graf nám ukazuje, že v případě kancelářského papíru, recyklovaného sešitu a novin bylo získáno nejvíce glukózy předúpravou mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH . U nerecyklovaného sešitu jsme získali největší množství glukózy za použití předúpravy mikrovlny + H_2SO_4 . Celkově se však výsledky výrazně liší a to z důvodu obsahu celulózy u jednotlivých papírů. Již recyklované papíry nám poskytují vyrovnanější výsledky zisku glukózy díky větší dostupnosti celulózy. Kdežto nerecyklované papíry musíme podrobovat náročnějším předúpravám a je zde vidět velký vliv kyseliny sírové.

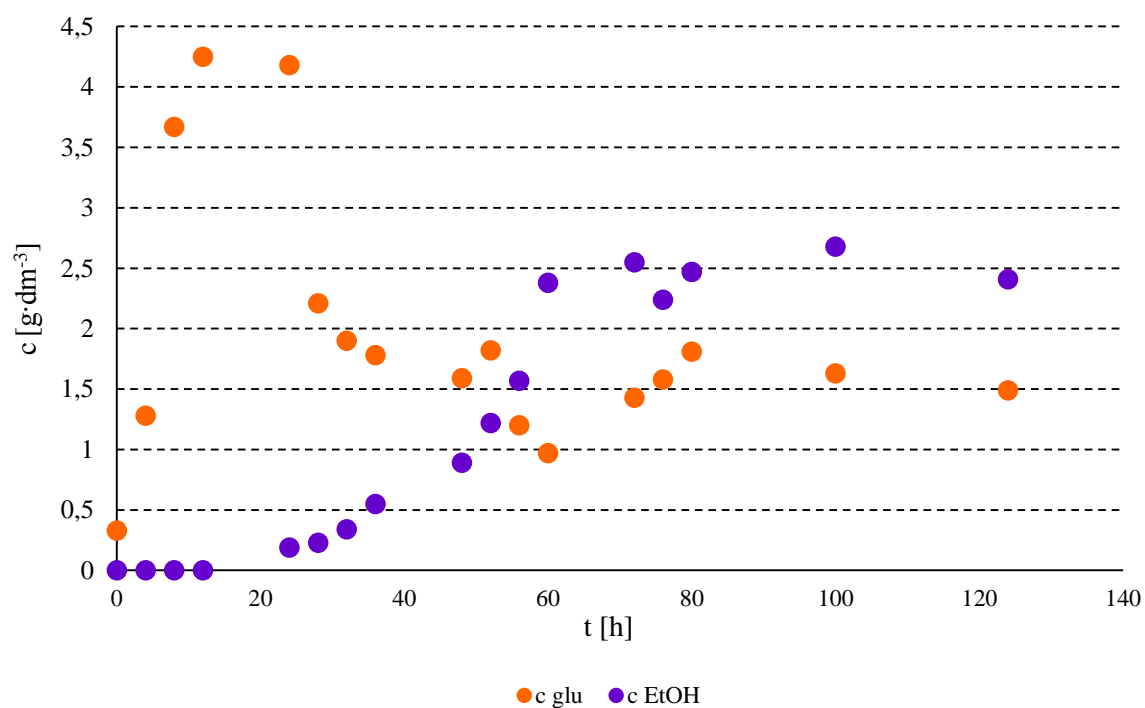
4.4 Simultánní sacharifikace a fermentace – SSF

Postup provedení simultánní sacharifikace a fermentace je uveden v kapitole 3.9. Během této metody byl sledován úbytek glukózy a nárůst koncentrace ethanolu. Veškeré výsledky jsou shrnuty do tabulek a graficky znázorněny pomocí grafů.

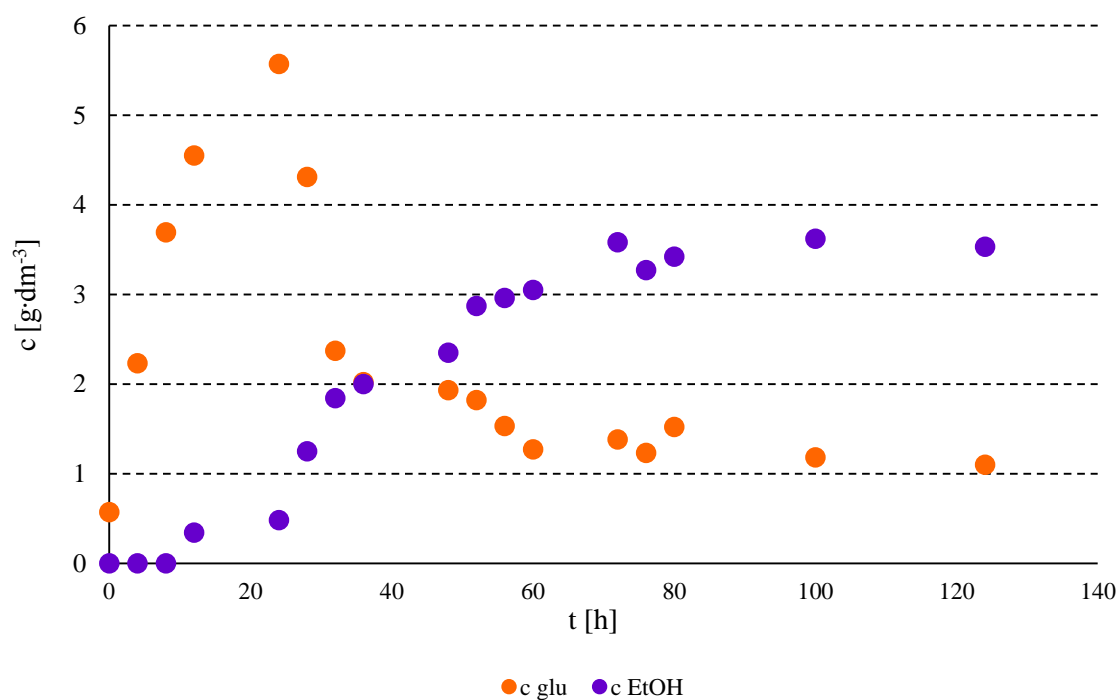
Tabulka 17: Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu z kancelářského papíru

t [h]	mletí		mikrovlny + NaOH	
	$c_{\text{glu}} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{glu}} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
0	$0,33 \pm 0,04$	0	$0,57 \pm 0,04$	0
4	$1,28 \pm 0,01$	0	$2,23 \pm 0,05$	0
8	$3,67 \pm 0,03$	0	$3,69 \pm 0,04$	0
12	$4,25 \pm 0,02$	0	$4,55 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,05$
24	$4,18 \pm 0,04$	$0,19 \pm 0,01$	$5,57 \pm 0,03$	$0,48 \pm 0,01$
28	$2,21 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,05$	$4,31 \pm 0,02$	$1,25 \pm 0,02$
32	$1,9 \pm 0,1$	$0,34 \pm 0,02$	$2,37 \pm 0,04$	$1,84 \pm 0,05$
36	$1,78 \pm 0,03$	$0,55 \pm 0,08$	$2,02 \pm 0,05$	$2,0 \pm 0,2$
48	$1,59 \pm 0,01$	$0,89 \pm 0,02$	$1,93 \pm 0,04$	$2,35 \pm 0,04$
52	$1,82 \pm 0,03$	$1,22 \pm 0,03$	$1,82 \pm 0,04$	$2,87 \pm 0,02$
56	$1,20 \pm 0,08$	$1,57 \pm 0,04$	$1,53 \pm 0,03$	$2,96 \pm 0,01$
60	$0,97 \pm 0,03$	$2,38 \pm 0,01$	$1,27 \pm 0,02$	$3,05 \pm 0,02$
72	$1,43 \pm 0,04$	$2,55 \pm 0,02$	$1,38 \pm 0,01$	$3,58 \pm 0,04$
76	$1,58 \pm 0,05$	$2,24 \pm 0,03$	$1,23 \pm 0,04$	$3,27 \pm 0,02$
80	$1,81 \pm 0,03$	$2,47 \pm 0,04$	$1,52 \pm 0,03$	$3,42 \pm 0,04$
100	$1,63 \pm 0,04$	$2,68 \pm 0,05$	$1,18 \pm 0,02$	$3,62 \pm 0,01$
124	$1,49 \pm 0,02$	$2,41 \pm 0,03$	$1,10 \pm 0,07$	$3,53 \pm 0,02$
t [h]	mikrovlny + H ₂ SO ₄		mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH	
	$c_{\text{glu}} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{glu}} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$	$c_{\text{EtOH}} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
0	$0,46 \pm 0,01$	0	$0,27 \pm 0,01$	0
4	$2,57 \pm 0,02$	0	$4,57 \pm 0,02$	0
8	$4,23 \pm 0,04$	$0,15 \pm 0,04$	$5,92 \pm 0,02$	$0,58 \pm 0,04$
12	$4,87 \pm 0,02$	$0,87 \pm 0,02$	$9,57 \pm 0,04$	$1,27 \pm 0,02$
24	$7,92 \pm 0,04$	$2,57 \pm 0,04$	$3,82 \pm 0,05$	$2,52 \pm 0,03$
28	$3,5 \pm 0,1$	$4,68 \pm 0,06$	$2,58 \pm 0,01$	$5,03 \pm 0,07$
32	$3,28 \pm 0,09$	$5,87 \pm 0,02$	$2,23 \pm 0,04$	$5,2 \pm 0,1$
36	$2,63 \pm 0,02$	$6,22 \pm 0,03$	$2,14 \pm 0,02$	$7,89 \pm 0,02$
48	$2,41 \pm 0,02$	$10,15 \pm 0,08$	$2,0 \pm 0,1$	$8,46 \pm 0,07$
52	$1,97 \pm 0,03$	$12,82 \pm 0,09$	$1,95 \pm 0,02$	$13,49 \pm 0,02$
56	$1,6 \pm 0,2$	$13,89 \pm 0,04$	$1,58 \pm 0,08$	$14,02 \pm 0,04$
60	$1,78 \pm 0,03$	$13,9 \pm 0,1$	$1,63 \pm 0,02$	$15,27 \pm 0,03$
72	$1,65 \pm 0,04$	$15,28 \pm 0,05$	$1,74 \pm 0,05$	$15,93 \pm 0,02$
76	$1,53 \pm 0,07$	$15,04 \pm 0,08$	$1,48 \pm 0,03$	$16,024 \pm 0,009$
80	$0,97 \pm 0,05$	$15,47 \pm 0,09$	$1,36 \pm 0,05$	$16,98 \pm 0,02$
100	$0,89 \pm 0,01$	$15,33 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,01$	$16,83 \pm 0,04$
124	$1,08 \pm 0,04$	$15,25 \pm 0,07$	$0,95 \pm 0,04$	$16,91 \pm 0,01$

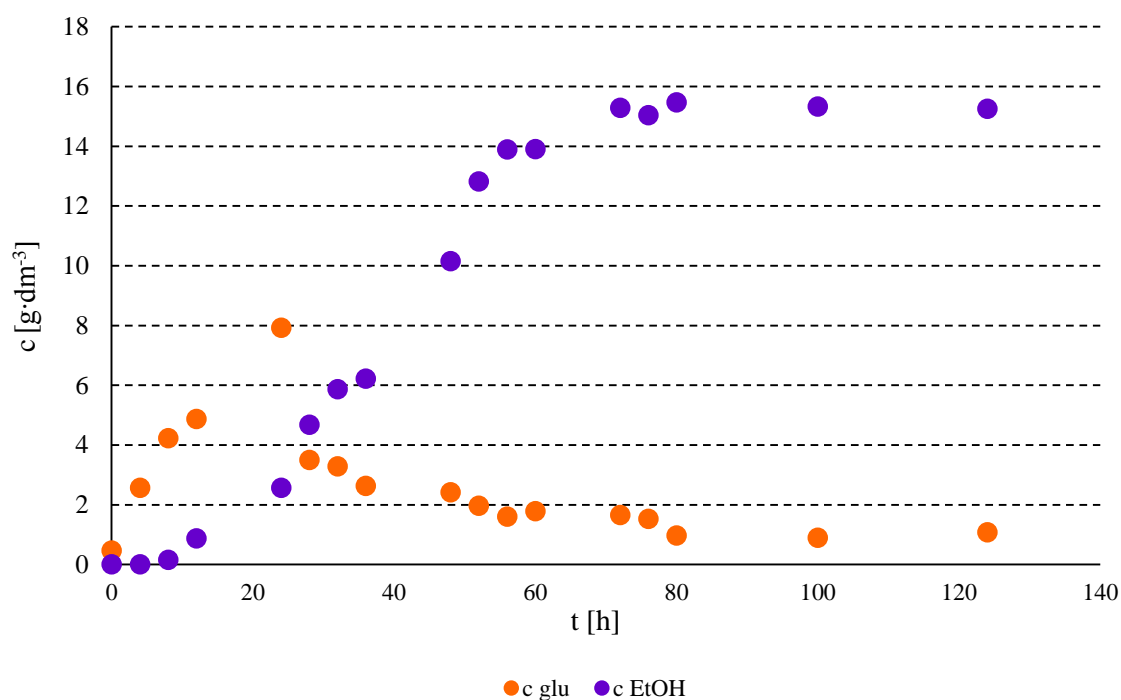
Graf 17: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z kancelářského papíru s předúpravou mletí



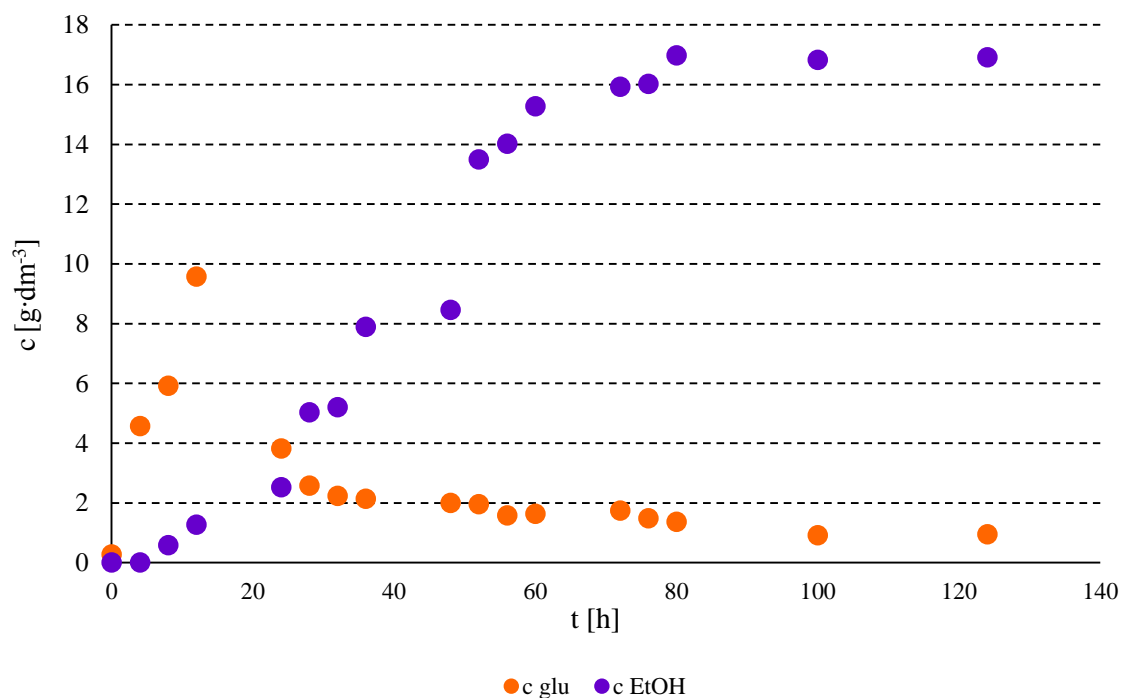
Graf 18: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z kancelářského papíru s předúpravou mikrovlny + NaOH



Graf 19: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z kancelářského papíru s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4



Graf 20: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z kancelářského papíru s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH

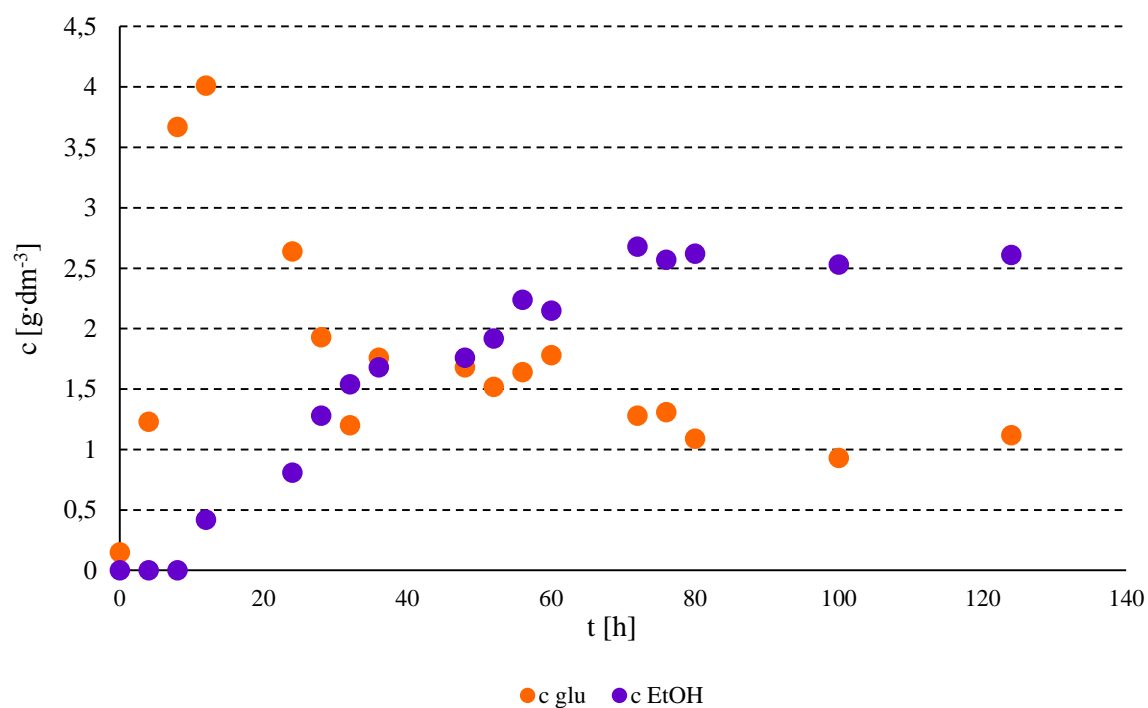


Z kancelářského papíru získáváme nejvyšší koncentraci ethanolu při použití předúpravy mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH. Koncentrace ethanolu činila $16,98 \pm 0,02 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Předúpravy mletí a mikrovlny + NaOH sice vykazují zisk ethanolu, ale jak nám již napovídá hydrolýza, kde byly výtěžky glukózy velmi malé, tak i konečné koncentrace ethanolu jsou zanedbatelné oproti druhým dvěma předúpravám.

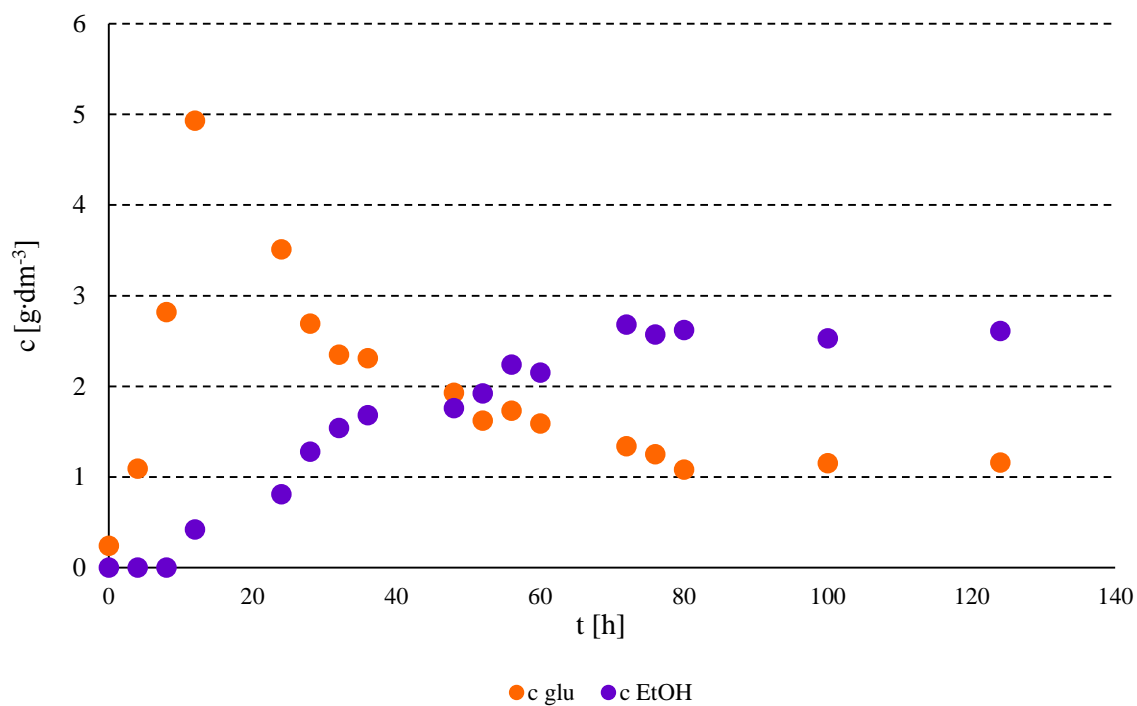
Tabulka 18: Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu z nerecyklovaného sešitu

	mletí		mikrovlny + NaOH	
t [h]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]
0	0,15 ± 0,03	0	0,24 ± 0,08	0
4	1,23 ± 0,02	0	1,09 ± 0,01	0
8	3,67 ± 0,04	0	2,82 ± 0,03	0
12	4,01 ± 0,05	0,42 ± 0,03	4,93 ± 0,02	0,18 ± 0,04
24	2,64 ± 0,04	0,81 ± 0,02	3,51 ± 0,04	0,32 ± 0,02
28	1,93 ± 0,01	1,28 ± 0,04	2,69 ± 0,02	0,83 ± 0,02
32	1,2 ± 0,2	1,54 ± 0,07	2,35 ± 0,02	1,06 ± 0,04
36	1,76 ± 0,04	1,68 ± 0,02	2,31 ± 0,01	1,27 ± 0,08
48	1,68 ± 0,02	1,76 ± 0,01	1,93 ± 0,04	1,56 ± 0,07
52	1,52 ± 0,08	1,92 ± 0,02	1,62 ± 0,05	1,92 ± 0,03
56	1,64 ± 0,09	2,24 ± 0,03	1,73 ± 0,04	2,67 ± 0,02
60	1,78 ± 0,05	2,15 ± 0,04	1,59 ± 0,05	2,85 ± 0,04
72	1,28 ± 0,04	2,68 ± 0,01	1,34 ± 0,07	3,24 ± 0,02
76	1,31 ± 0,02	2,57 ± 0,04	1,25 ± 0,08	3,37 ± 0,04
80	1,09 ± 0,01	2,62 ± 0,01	1,08 ± 0,02	3,19 ± 0,04
100	0,93 ± 0,08	2,53 ± 0,05	1,15 ± 0,04	3,34 ± 0,02
124	1,12 ± 0,04	2,61 ± 0,02	1,16 ± 0,02	3,23 ± 0,02
	mikrovlny + H₂SO₄		mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH	
t [h]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]
0	0,83 ± 0,02	0	0,38 ± 0,01	0
4	3,47 ± 0,04	0	2,46 ± 0,05	0
8	5,97 ± 0,02	0,67 ± 0,04	4,52 ± 0,02	0,96 ± 0,02
12	6,21 ± 0,03	1,24 ± 0,04	8,67 ± 0,03	2,16 ± 0,01
24	4,37 ± 0,02	1,92 ± 0,03	5,26 ± 0,06	2,85 ± 0,02
28	3,05 ± 0,08	2,48 ± 0,04	4,28 ± 0,02	3,64 ± 0,03
32	2,27 ± 0,05	4,59 ± 0,03	2,69 ± 0,01	4,69 ± 0,05
36	1,24 ± 0,02	6,89 ± 0,02	2,35 ± 0,02	7,13 ± 0,08
48	1,03 ± 0,04	8,12 ± 0,03	1,97 ± 0,05	9,27 ± 0,02
52	1,52 ± 0,04	9,57 ± 0,04	1,56 ± 0,04	10,36 ± 0,02
56	1,64 ± 0,02	12,58 ± 0,03	1,49 ± 0,03	11,59 ± 0,03
60	1,48 ± 0,03	12,86 ± 0,02	1,68 ± 0,02	12,97 ± 0,02
72	1,24 ± 0,02	13,05 ± 0,01	1,28 ± 0,04	14,38 ± 0,06
76	1,33 ± 0,01	13,54 ± 0,04	1,35 ± 0,02	15,02 ± 0,03
80	1,52 ± 0,04	13,28 ± 0,02	1,52 ± 0,01	15,25 ± 0,04
100	0,93 ± 0,02	13,58 ± 0,01	1,27 ± 0,02	15,24 ± 0,02
124	1,24 ± 0,03	13,46 ± 0,02	1,16 ± 0,03	15,21 ± 0,04

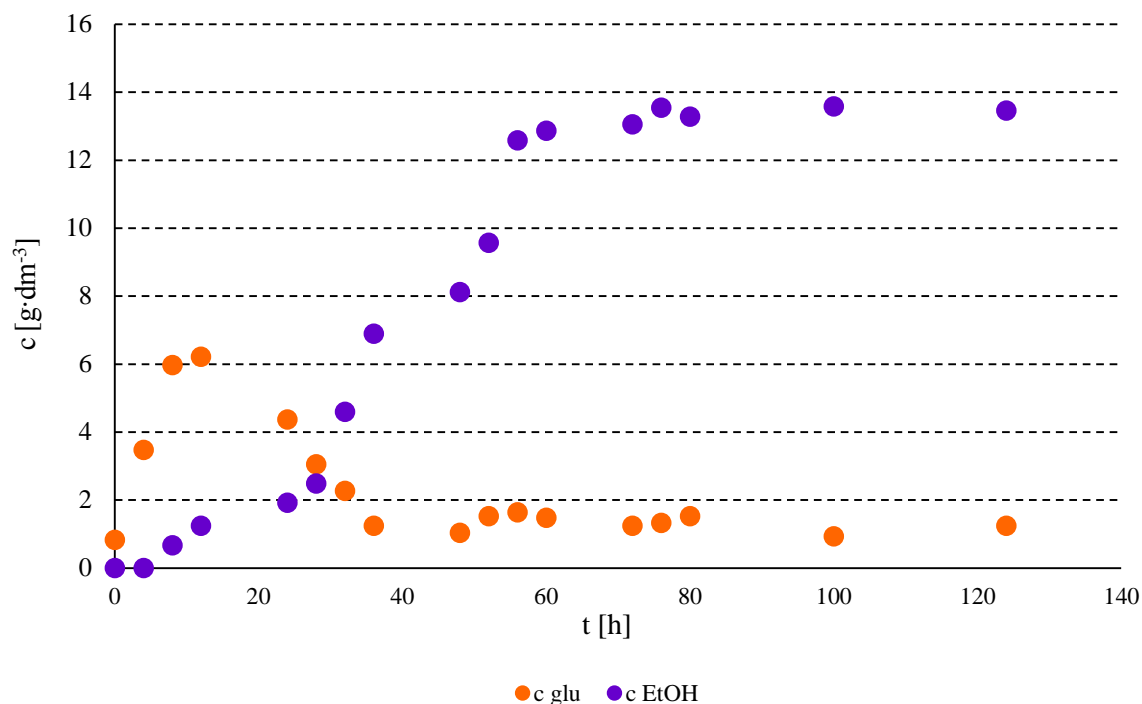
Graf 21: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z nerecyklovaného sešitu s předúpravou mletí



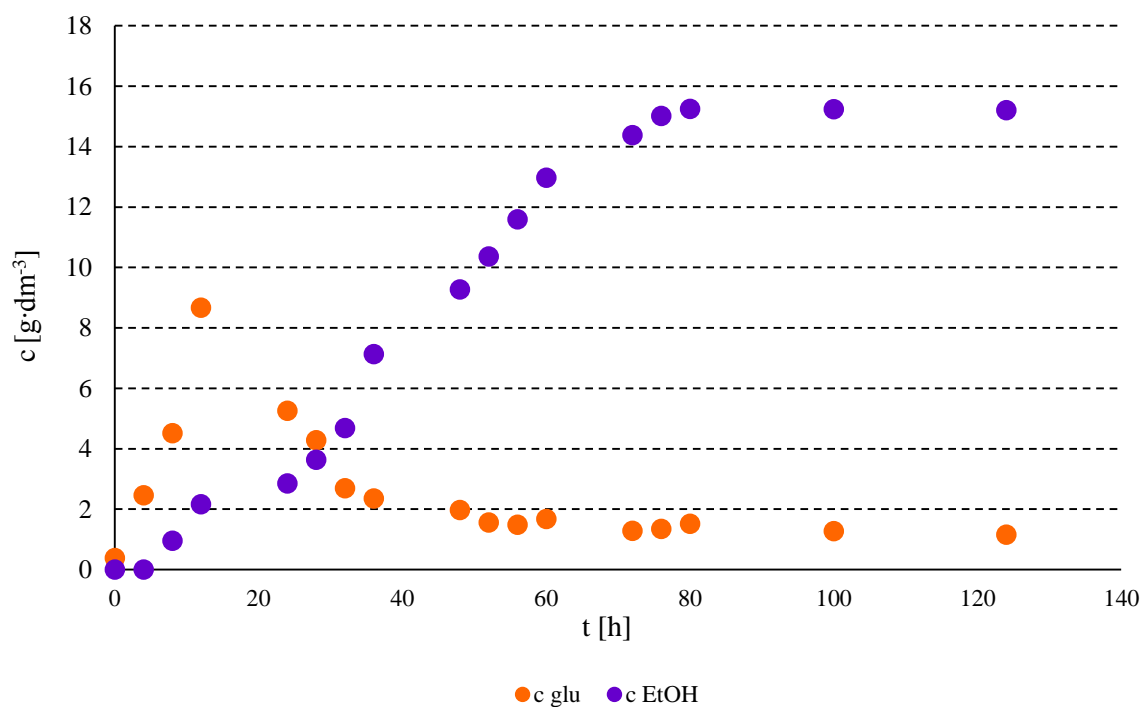
Graf 22: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z nerecyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + NaOH



Graf 23: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z nerecyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4



Graf 24: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z nerecyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH



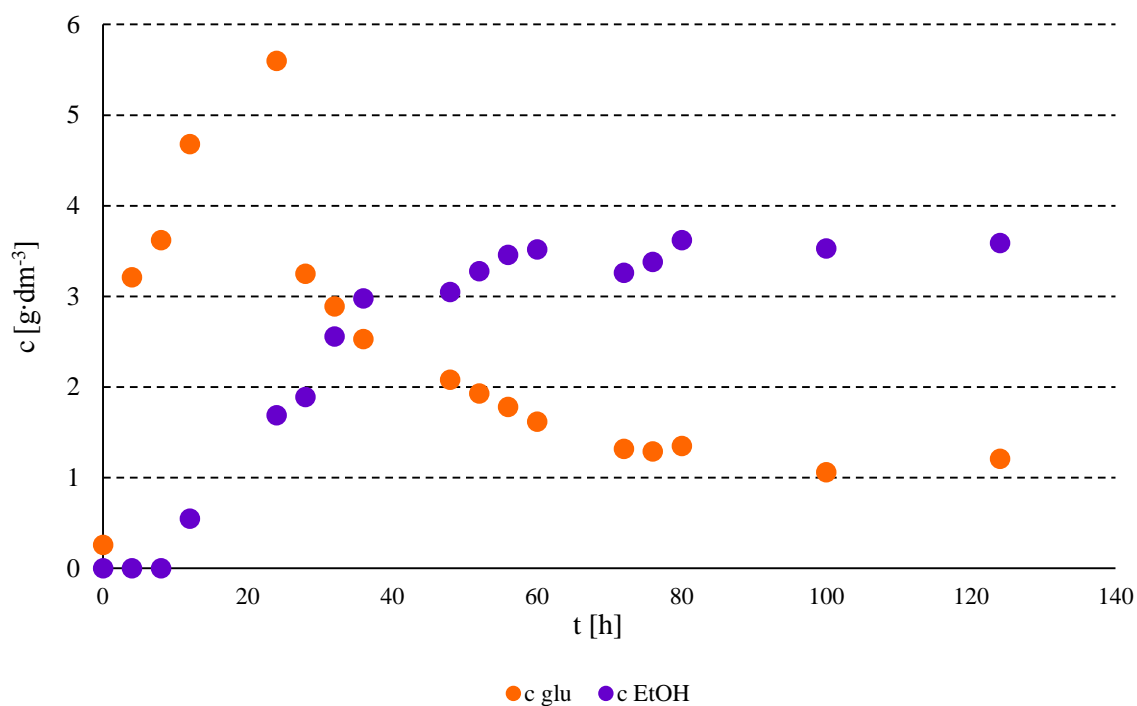
U nerecyklovaného sešitu byla nejvyšší koncentrace ethanolu získána u předúpravy mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH a to $15,25 \pm 0,04 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Podobný výsledek byl dosažen i pomocí předúpravy mikrovlny + H_2SO_4 . Stejně jako u kancelářského papíru nebyly koncentrace u

předúprav mletí a mikrovlny + NaOH nijak vysoké. Opět je to způsobeno nedostatečným účinkem předúpravy na dostupnost celulózy.

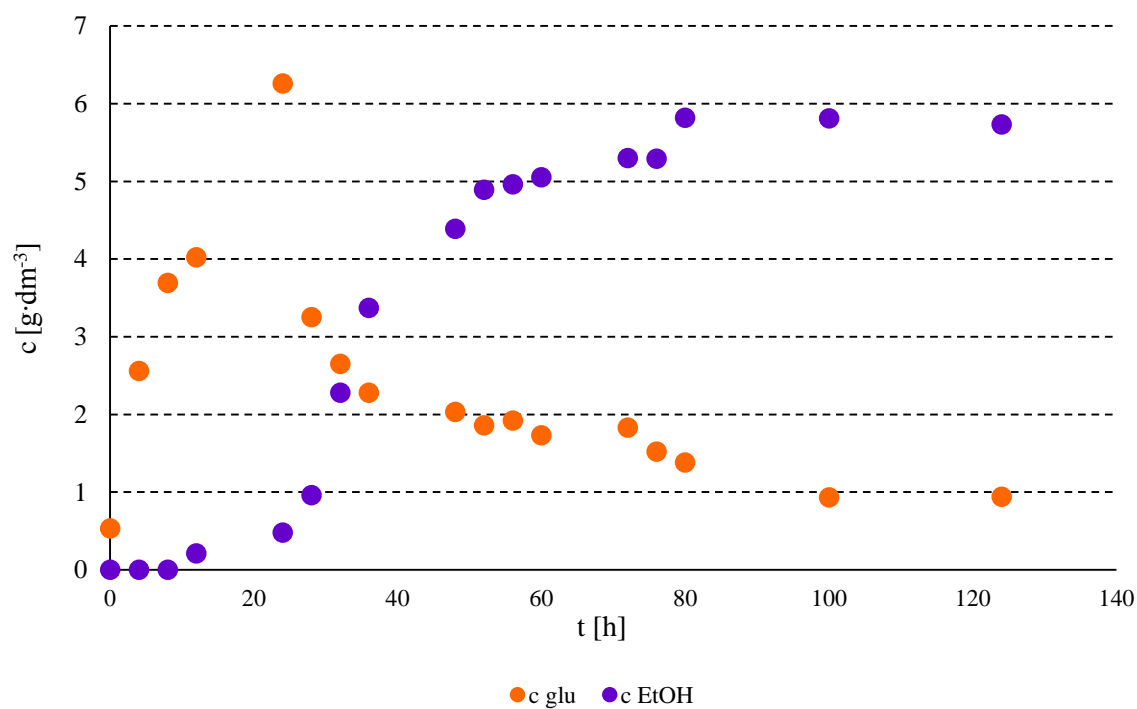
Tabulka 19: Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu z recyklovaného sešitu

	mletí		mikrovlny + NaOH	
t [h]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]
0	0,26 ± 0,02	0	0,53 ± 0,03	0
4	3,21 ± 0,04	0	2,56 ± 0,04	0
8	3,62 ± 0,03	0	3,69 ± 0,02	0
12	4,68 ± 0,04	0,55 ± 0,02	4,02 ± 0,05	0,21 ± 0,02
24	5,60 ± 0,01	1,69 ± 0,03	6,26 ± 0,02	0,48 ± 0,03
28	3,25 ± 0,02	1,89 ± 0,06	3,25 ± 0,03	0,96 ± 0,02
32	2,89 ± 0,04	2,56 ± 0,02	2,65 ± 0,02	2,28 ± 0,03
36	2,53 ± 0,02	2,98 ± 0,04	2,28 ± 0,01	3,37 ± 0,04
48	2,08 ± 0,01	3,05 ± 0,01	2,03 ± 0,02	4,39 ± 0,02
52	1,93 ± 0,02	3,28 ± 0,04	1,86 ± 0,07	4,89 ± 0,03
56	1,78 ± 0,04	3,46 ± 0,08	1,92 ± 0,03	4,96 ± 0,03
60	1,62 ± 0,05	3,52 ± 0,04	1,73 ± 0,02	5,05 ± 0,07
72	1,32 ± 0,03	3,26 ± 0,04	1,83 ± 0,04	5,3 ± 0,2
76	1,29 ± 0,02	3,38 ± 0,05	1,52 ± 0,05	5,29 ± 0,01
80	1,35 ± 0,02	3,62 ± 0,01	1,38 ± 0,02	5,82 ± 0,02
100	1,06 ± 0,02	3,53 ± 0,02	0,93 ± 0,02	5,81 ± 0,03
124	1,21 ± 0,05	3,59 ± 0,04	0,94 ± 0,01	5,73 ± 0,05
	mikrovlny + H₂SO₄		mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH	
t [h]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]
0	0,35 ± 0,03	0	0,42 ± 0,05	0
4	3,28 ± 0,02	0	4,52 ± 0,01	0
8	4,69 ± 0,08	0	6,13 ± 0,02	0
12	6,93 ± 0,02	1,27 ± 0,02	7,26 ± 0,04	1,06 ± 0,02
24	8,64 ± 0,03	2,68 ± 0,01	10,35 ± 0,05	1,96 ± 0,03
28	5,68 ± 0,02	5,62 ± 0,02	6,92 ± 0,02	4,49 ± 0,02
32	4,62 ± 0,08	6,37 ± 0,04	3,59 ± 0,01	5,68 ± 0,05
36	3,89 ± 0,07	7,53 ± 0,02	2,99 ± 0,02	8,26 ± 0,08
48	2,52 ± 0,02	7,98 ± 0,05	2,23 ± 0,05	9,35 ± 0,09
52	2,16 ± 0,08	9,21 ± 0,02	2,10 ± 0,02	10,12 ± 0,06
56	1,95 ± 0,07	9,68 ± 0,07	1,85 ± 0,04	10,57 ± 0,07
60	1,86 ± 0,02	9,98 ± 0,02	1,56 ± 0,02	10,92 ± 0,03
72	1,63 ± 0,05	10,93 ± 0,01	1,38 ± 0,03	11,38 ± 0,04
76	1,57 ± 0,02	11,24 ± 0,02	1,15 ± 0,02	11,98 ± 0,05
80	1,27 ± 0,03	11,38 ± 0,04	1,06 ± 0,08	12,15 ± 0,04
100	1,08 ± 0,04	11,26 ± 0,03	0,96 ± 0,04	12,20 ± 0,02
124	1,15 ± 0,02	11,41 ± 0,08	0,83 ± 0,04	12,14 ± 0,03

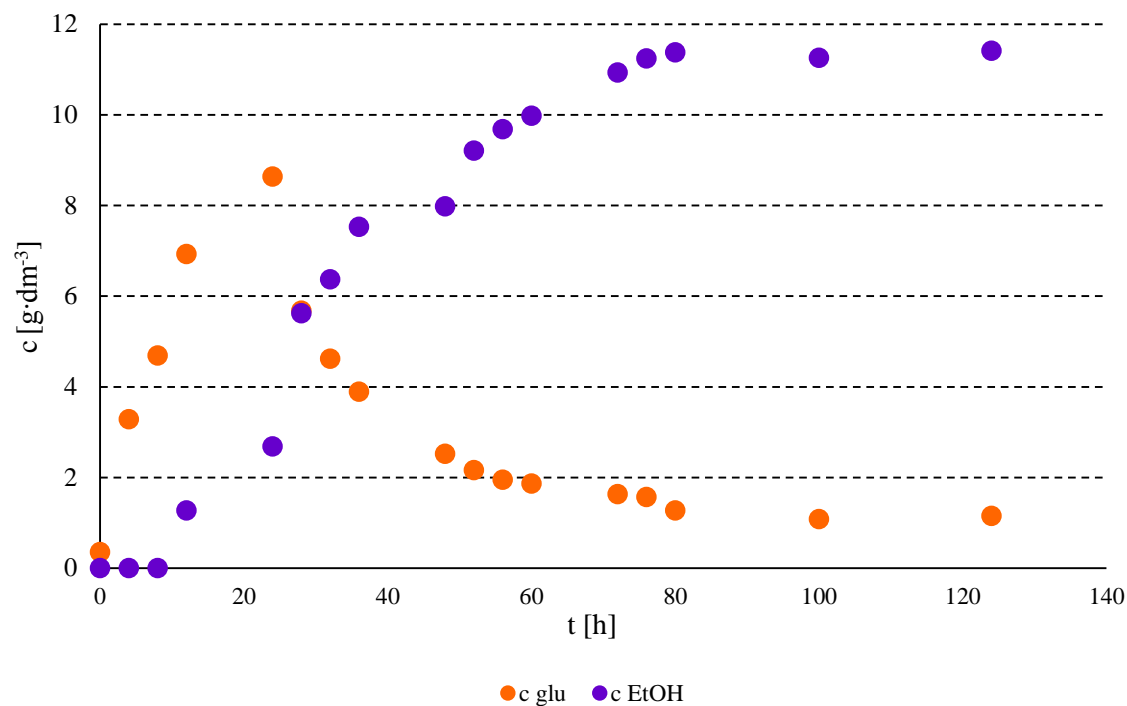
Graf 25: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z recyklovaného sešitu s předúpravou mletí



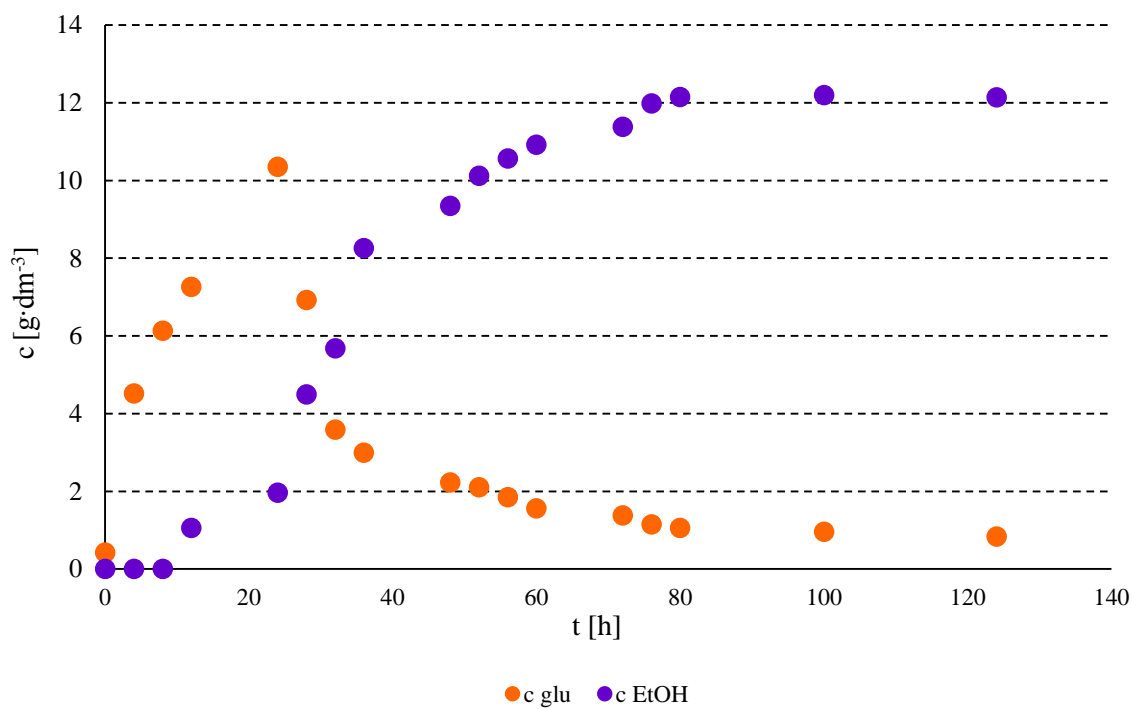
Graf 26: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z recyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + NaOH



Graf 27: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z recyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4



Graf 28: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z recyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH



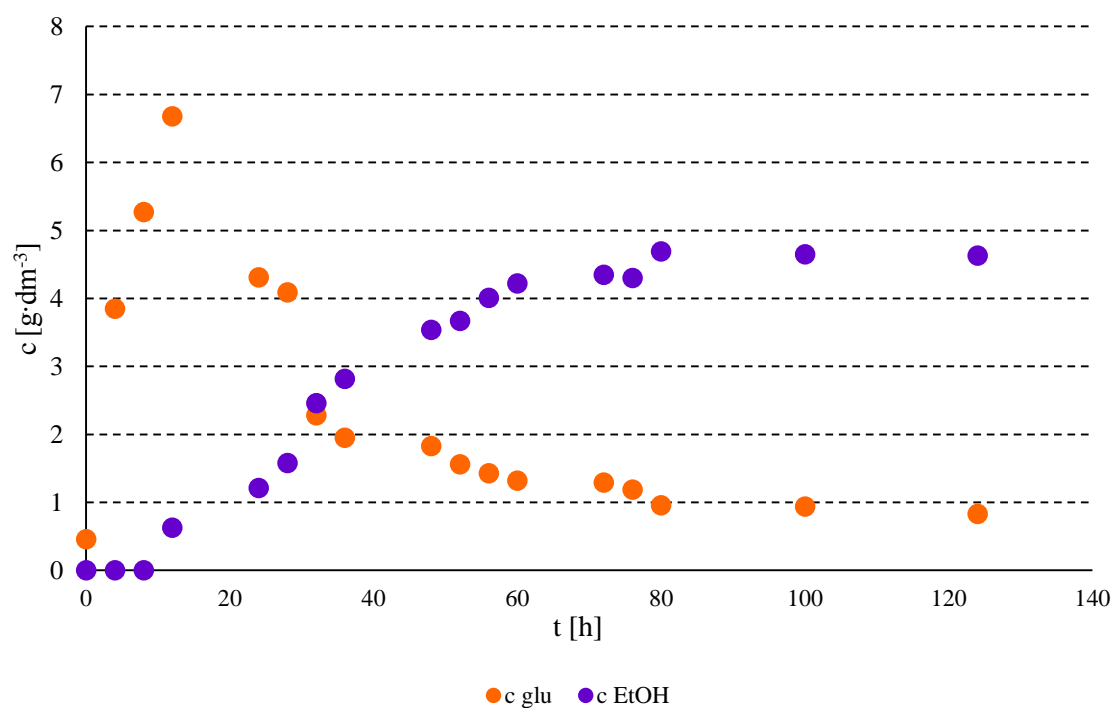
V případě recyklovaného sešitu již pozorujeme nárůst koncentrací ethanolu již při prvních dvou předúpravách. Stále zde však platí, že nejvyšší koncentraci ethanolu nám poskytuje

předúprava mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH. Koncentrace u této předúpravy dosahovala $12,20 \pm 0,02 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

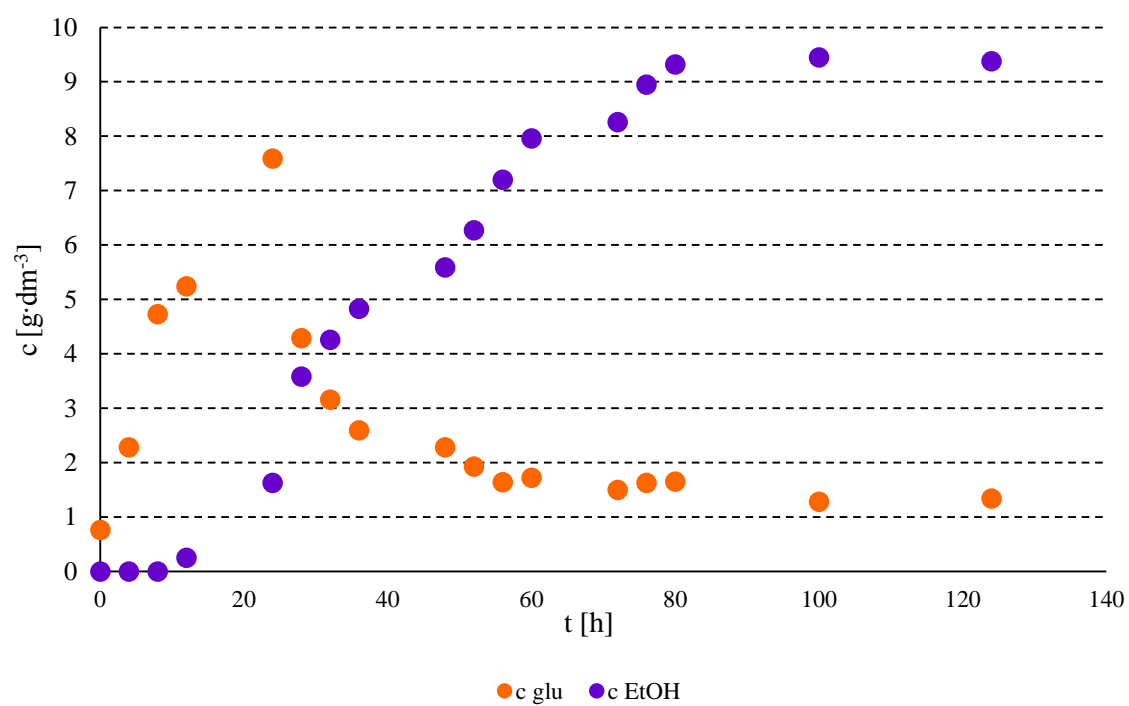
Tabulka 20: Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu z novin

	mletí		mikrovlny + NaOH	
t [h]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]
0	0,46 ± 0,04	0	0,76 ± 0,02	0
4	3,85 ± 0,04	0	2,28 ± 0,01	0
8	5,27 ± 0,03	0	4,73 ± 0,03	0
12	6,68 ± 0,01	0,63 ± 0,02	5,24 ± 0,02	0,25 ± 0,02
24	4,31 ± 0,05	1,21 ± 0,02	7,59 ± 0,04	1,63 ± 0,06
28	4,09 ± 0,08	1,58 ± 0,03	4,29 ± 0,02	3,58 ± 0,04
32	2,28 ± 0,06	2,46 ± 0,01	3,16 ± 0,02	4,26 ± 0,03
36	1,95 ± 0,02	2,82 ± 0,05	2,59 ± 0,01	4,83 ± 0,02
48	1,83 ± 0,01	3,54 ± 0,01	2,28 ± 0,02	5,59 ± 0,01
52	1,56 ± 0,08	3,67 ± 0,02	1,93 ± 0,05	6,27 ± 0,02
56	1,43 ± 0,02	4,01 ± 0,03	1,64 ± 0,03	7,2 ± 0,2
60	1,32 ± 0,01	4,22 ± 0,05	1,72 ± 0,02	7,96 ± 0,03
72	1,29 ± 0,02	4,35 ± 0,02	1,5 ± 0,1	8,26 ± 0,04
76	1,19 ± 0,02	4,30 ± 0,04	1,63 ± 0,01	8,95 ± 0,02
80	0,96 ± 0,03	4,69 ± 0,05	1,65 ± 0,02	9,32 ± 0,01
100	0,94 ± 0,04	4,65 ± 0,02	1,28 ± 0,02	9,45 ± 0,03
124	0,83 ± 0,05	4,63 ± 0,02	1,34 ± 0,03	9,38 ± 0,05
	mikrovlny + H₂SO₄		mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH	
t [h]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]	c _{glu} [g·dm ⁻³]	c _{EtOH} [g·dm ⁻³]
0	0,53 ± 0,04	0	0,37 ± 0,01	0
4	3,26 ± 0,08	0	5,13 ± 0,05	0
8	5,08 ± 0,02	0	5,89 ± 0,04	0
12	6,17 ± 0,03	0,32 ± 0,02	6,12 ± 0,03	0,73 ± 0,01
24	8,42 ± 0,1	1,59 ± 0,02	8,52 ± 0,02	2,16 ± 0,02
28	5,29 ± 0,03	2,67 ± 0,03	4,87 ± 0,03	3,58 ± 0,05
32	3,48 ± 0,02	3,06 ± 0,05	4,21 ± 0,05	4,15 ± 0,04
36	3,18 ± 0,06	3,59 ± 0,01	3,56 ± 0,06	4,59 ± 0,02
48	2,83 ± 0,04	4,89 ± 0,02	3,01 ± 0,05	5,16 ± 0,03
52	2,06 ± 0,09	6,55 ± 0,04	2,93 ± 0,04	6,95 ± 0,02
56	1,93 ± 0,08	7,34 ± 0,01	2,25 ± 0,02	7,59 ± 0,03
60	1,52 ± 0,07	8,92 ± 0,02	1,95 ± 0,03	9,18 ± 0,01
72	1,28 ± 0,02	9,14 ± 0,06	1,67 ± 0,04	11,13 ± 0,04
76	1,32 ± 0,01	10,62 ± 0,05	1,52 ± 0,03	11,32 ± 0,02
80	1,22 ± 0,03	11,22 ± 0,03	1,13 ± 0,08	12,18 ± 0,04
100	1,16 ± 0,08	11,3 ± 0,1	0,82 ± 0,02	12,59 ± 0,03
124	1,05 ± 0,07	11,28 ± 0,02	0,66 ± 0,04	12,34 ± 0,04

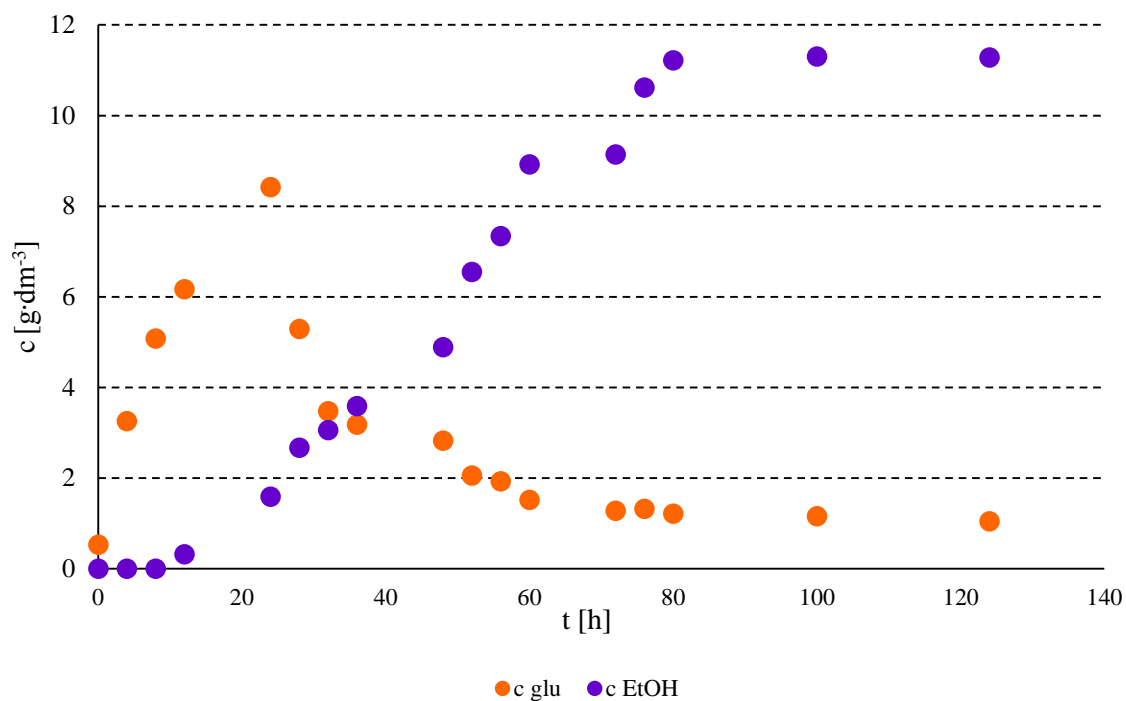
Graf 29: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z novin s předúpravou mletí



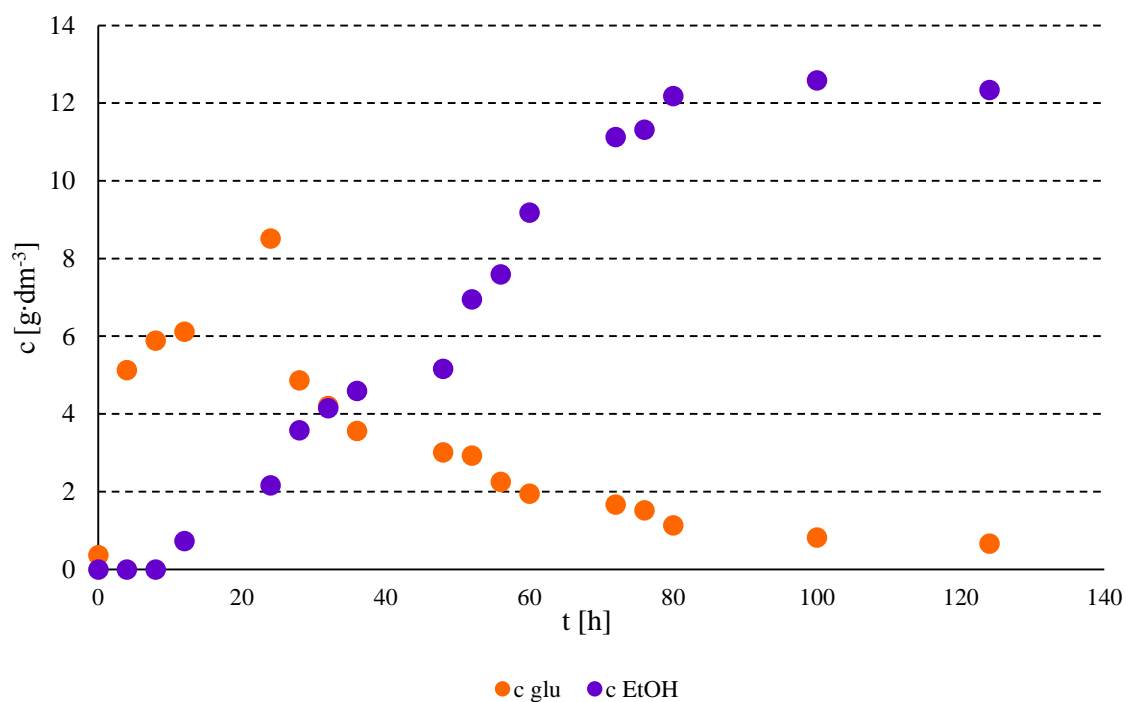
Graf 30: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z novin s předúpravou mikrovlny + NaOH



Graf 31: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z novin s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4

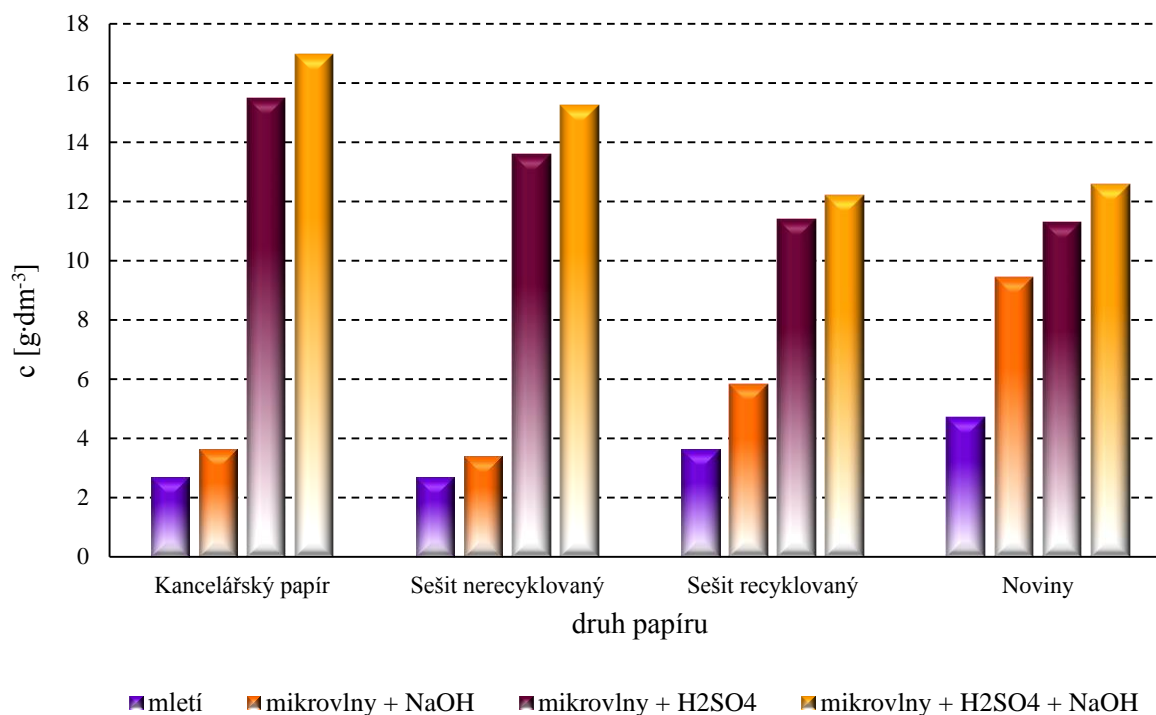


Graf 32: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z novin s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH



U novin byla získána nejvyšší koncentrace ethanolu při použití předúpravy mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH a to $12,59 \pm 0,03 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Nicméně již při prvních dvou předúpravách získáváme vyšší množství ethanolu než u nerecyklovaných papírů. Je to způsobeno několikanásobnou recyklací papíru, který se pro noviny používá.

Graf 33: Celkové srovnání konečných koncentrací ethanolu



Srovnávací graf ukazuje, že stejně jako u hydrolýzy byly ve všech případech nejvíce účinné předúpravy s použitím kyseliny. Celkově nejvyšší koncentraci ethanolu získáváme z kancelářského papíru za použití předúpravy mikrovlny + H₂SO₄ + NaOH. U novin a recyklovaného sešitu je možno konstatovat, že pro získání ethanolu jsou použitelné všechny předúpravy. Výsledky hydrolýzy i SSF dokazují, že na získání glukózy a ethanolu nemá vliv znečištění jednotlivých papírů. Vše je závislé na kvalitě papíru, čili obsahu plnidel a celulózy.

5 ZÁVĚR

Cílem práce bylo optimalizovat produkci ethanolu z odpadního papíru pomocí kvasinkových systémů. Jako kvasinkový systém byly zvoleny kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* CNCTC 6646. Byly vybrány čtyři substráty pro produkci glukózy a následně samotného ethanolu. Jednalo se o kancelářský papír, nerecyklovaný sešit, recyklovaný sešit a noviny. U těchto substrátů byl zkoumán vliv stupně recyklace na produkci ethanolu a také vliv znečištění. Pro hydrolýzu substrátu byly použity enzymy zakoupené u společnosti Novozymes®. Přesně se jednalo o produktovou řadu *Novozymes' cellulosic ethanol enzyme kit*.

Jelikož mají použité enzymy teplotní optimum mezi 45 °C a 50 °C bylo nejprve nutné optimalizovat růst kvasinek. Toho bylo dosaženo pomocí růstových křivek, kdy kultivace probíhala při 35 °C, 40 °C a 45 °C. Při 45 °C již nedocházelo k růstu kvasinek, proto byla teplota 40 °C zvolena jako kompromis pro růst kvasinek a činnost enzymů. Při této teplotě byla prováděna hydrolýza i simultánní sacharifikace a fermentace.

Dále byla provedena kompoziční a kvantitativní analýza substrátu za účelem zjištění obsahu sušiny, popela a celulózy. Obsah sušiny se u jednotlivých papírů nijak výrazně nelišil a dosahoval 94 – 95 %. Výrazné rozdíly mezi jednotlivými papíry a hlavně mezi předúpravami bylo možné pozorovat u stanovení obsahu popela. Nevyšší obsah popela byl zjištěn u kancelářského papíru s předúpravou mletí $24,8 \pm 0,1$ % a následně jeho obsah klesal s použitými předúpravami. Nejmenší obsah popela měly noviny předupravené kombinací mikrovln + H_2SO_4 + NaOH $1,2 \pm 0,04$ %. Množství celulózy nám napovědělo jaký výtěžek glukózy je možno očekávat v průběhu hydrolýzy. Nejvyšší množství celulózy obsahoval kancelářský papír a to $78,21 \pm 0,04$ %. Toto množství bylo zjištěno u předúpravy mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH.

Hydrolýza probíhala při 40 °C po dobu 82 h s citran-fosforečnanovým pufrům o pH 4,8. Hydrolýza byla prováděna jako 6 % w/w suspenze papíru. Nejprve byly stanoveny kalibrační křivky glukózy a ethanolu pro následné SSF. Vyhodnocení bylo provedeno pomocí HPLC analýzy. U všech papírů byla stanovena nejvyšší koncentrace glukózy s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH. Nevyšší koncentraci $24,69 \pm 0,03 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ obsahoval kancelářský papír a nejnižší u této předúpravy noviny $15,36 \pm 0,04 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Výrazné rozdíly bylo možno pozorovat u předúprav mletí a mikrovlny + NaOH, zatímco u kancelářského papíru a nerecyklovaného sešitu byly koncentrace glukózy zanedbatelné, tak v případě recyklovaného sešitu a novin pozorujeme výraznější tvorbu glukózy. Což vyplývá již z analýzy substrátu, kdy nerecyklované papíry obsahovaly daleko menší množství plnidel (popela) a tím pádem je jejich celulóza dostupnější pro enzymy.

Simultánní sacharifikace a fermentace probíhala za stejných podmínek jako hydrolýza, jen byl prodloužen čas na 124 h pro zachycení celého průběhu tvorby ethanolu. SSF byla provedena u všech předúprav substrátu pro potvrzení výsledků získaných z hydrolýzy. Nejvyšších koncentrací ethanolu bylo stejně jako u hydrolýzy dosaženo u papírů s předúpravou mikrovlny + H_2SO_4 + NaOH. Dále je možno konstatovat, že množství ethanolu získané SSF záleželo výhradně na použité předúpravě, obsahu celulózy a nebylo nijak ovlivněno znečištěním papírů. Pro přehlednost jsou dosažené výsledky uvedeny v Tabulce 21.

Tabulka 21: Srovnání konečné koncentrace ethanolu

Druh papíru	Způsob předúpravy	$c_{\text{EtOH}} [\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}]$
Kancelářský papír	mletí	$2,68 \pm 0,05$
	kombinace mikrovln + NaOH	$3,62 \pm 0,01$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4	$15,47 \pm 0,09$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4 + NaOH	$16,98 \pm 0,02$
Sešit nerecyklovaný	mletí	$2,68 \pm 0,01$
	kombinace mikrovln + NaOH	$3,37 \pm 0,04$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4	$13,58 \pm 0,01$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4 + NaOH	$15,25 \pm 0,04$
Sešit recyklovaný	mletí	$3,62 \pm 0,01$
	kombinace mikrovln + NaOH	$5,82 \pm 0,02$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4	$11,41 \pm 0,08$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4 + NaOH	$12,20 \pm 0,02$
Noviny	mletí	$4,69 \pm 0,05$
	kombinace mikrovln + NaOH	$9,45 \pm 0,03$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4	$11,3 \pm 0,1$
	kombinace mikrovln + H_2SO_4 + NaOH	$12,59 \pm 0,03$

Seznam použité literatury

- [1] BALAT, Mustafa, Havva BALAT a Cahide ÖZ. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and Combustion Science* [online]. 2008, vol. 34, issue 5, s. 551-573 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1016/j.pecs.2007.11.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve>
- [2] CELJAK, Ivo: Biomasa je nezbytná součást lidského života. *Biom.cz* [online]. 2008-12-22 [cit. 2014-03-27]. Dostupné z WWW: <<http://biom.cz/cz/odborne-clanky/biomasa-je-nezbytna-soucast-lidskeho-zivota>>. ISSN: 1801-2655.
- [3] LEE, Jeewon. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Journal of Biotechnology* [online]. 1997, vol. 56, issue 1, s. 1-24 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1016/S0168-1656(97)00073-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165697000734>
- [4] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2005, 606 s., 32 s. obr. příl. ISBN 978-80-246-1036-8.
- [5] KODÍČEK, Milan. *Biochemické pojmy: výkladový slovník: elektronická interaktivní verze*. Verze 2.0, 2007. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2007. ISBN 978-80-7080-669-2.
- [6] BLAŽEJ, Anton a Pavel KRKOŠKA. *Technológia výroby papiera*. 1. vyd. Bratislava: Alfa, 1989. ISBN 80-050-0119-3.
- [7] KORDA, Josef a Pavel KRKOŠKA. *Papírenská encyklopedie*. 1. vyd. Praha: SNTL, 1989, 469 s. ISBN 80-030-0647-3.
- [8] OŠMEROVÁ, Iva. *Recyklační technologie a technická zařízení pro využití odpadního papíru*. Brno, 2011. Dostupné z: <http://is.mendelu.cz/zp/index.pl?podrobnosti=40224>. Bakalářská práce. Mendelova univerzita. Vedoucí práce Ing. Zdeněk Konrád, Ph.D.
- [9] ŠMEJKAL, Miroslav. Brikety ze starého papíru pro energetické využití. In: *EKOnoviny* [online]. 2009 [cit. 04.04.2014]. Dostupné z: <http://www.eurochem.cz/index.php?LA=CS&MN=Brikety+ze+star%E9ho+pap%E9dru+pro+energetick%E9+vyu%E9it%E9&ProdID=00028F0667F064860002E8C6&DT=4097&TXTID=2033>
- [10] CARPITA, Nicholas C., David M. GIBEAUT, Satarupa BANNERJEE a Kaustav AIKAT. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal* [online]. 1993, vol. 3, issue 1, s. 1-30 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1111/j.1365-313X.1993.tb00007.x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890410003791>
- [11] SCOTT, Samuel, Magid DAGHER. Identifying Energy Needs & Biomass Resources. In: [online]. 2002 [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: <http://energy.mississippi.org/energycd/Report/ENERGYREPORT.htm>
- [12] OLSSON, Lisbeth a Bärbel HAHN-HÄGERDAL. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1996, vol. 18, issue 5, s. 312-331 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1016/0141-0229(95)00157-3. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004574>
- [13] Formation and Chemistry of Wood: Chemical Composition of Wood. In: *The Nature of Wood and Wood Products* [online]. [cit. 2014-03-27]. Dostupné z: <http://ifbholz.ethz.ch/natureofwood/pc/ch/ch12.html>
- [14] HENDRIKS, A.T.W.M. a G. ZEEMAN. *Bioresource Technology* [online]. 2009, vol. 100, issue 1, s. 10-18 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004574>
- [15] FAN, L. T., Young-Hyun LEE a M. M. GHARPURAY. The nature of lignocellulosics and their pretreatments for enzymatic hydrolysis. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1996,

vol. 18, issue 5, s. 157 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1007/3540116982_4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022995001573>

[16] MOORE, D, G ROBSON a A TRINCI. *21st century guidebook to fungi* [online]. New York: Cambridge University Press, xii, 627 p., [62] p. of col. plates [cit. 2014-03-27]. ISBN 978-052-1186-957.

[17] SUN, Ye a Jiayang CHENG. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology* [online]. 2002, vol. 83, issue 1, s. 1-11 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.

[18] LIU, Zhijia a Benhua FEI. Characteristics of Moso Bamboo with Chemical Pretreatment: a review. *Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization* [online]. InTech, 2013-05-15, vol. 83, issue 1, s. 1-11 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.5772/55379. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852401002127>

[19] HARUN, Razif, W.S.Y. JASON, Tamara CHERRINGTON a Michael K. DANQUAH. WITHDRAWN: Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for, bioethanol production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2010, s. - [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.1016/j.rser.2010.07.071. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032110002510>

[20] HENDRIKS, A.T.W.M., W.S.Y. ZEEMAN, Tamara CHERRINGTON a Michael K. DANQUAH. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass: Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for, bioethanol production. *Bioresource Technology* [online]. 2009, vol. 100, issue 1, s. 10-18 [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.05.027. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852408004574>

[21] TAHERZADEH, Mohammad J., Keikhosro KARIMI, Tamara CHERRINGTON a Michael K. DANQUAH. Pretreatment of Lignocellulosic Wastes to Improve Ethanol and Biogas Production: Microalgal biomass as a cellulosic fermentation feedstock for, bioethanol production. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2008, vol. 9, issue 9, s. 1621-1651 [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.3390/ijms9091621. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/9/9/1621/>

[22] ALVIRA, P., E. TOMÁS-PEJÓ, M. BALLESTEROS a M.J. NEGRO. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A Review. *Bioresource Technology* [online]. 2010, vol. 101, issue 13, s. 4851-4861 [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.1016/j.biortech.2009.11.093. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852409015983>

[23] KUMAR, Parveen, Diane M. BARRETT, Michael J. DELWICHE a Pieter STROEVE. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production: A review. *Industrial* [online]. 2009-04-15, vol. 48, issue 8, s. 4851-4861 [cit. 2014-03-29]. DOI: 10.1021/ie801542g. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie801542g>

[24] SINGH, Renu, Ashish SHUKLA, Sapna TIWARI a Monika SRIVASTAVA. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* [online]. 2014, vol. 32, s. 713-728 [cit. 2014-03-30]. DOI: 10.1016/j.rser.2014.01.051. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114000628>

[25] BALAT, Mustafa, Sumanta Kumar GHOSH, Satarupa BANNERJEE a Kaustav AIKAT. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management* [online]. 2011, vol. 52, issue 2, s. 19-27 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1016/j.enconman.2010.08.013. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0196890410003791>

- [26] SARKAR, Nibedita, Sumanta Kumar GHOSH, Satarupa BANNERJEE. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy* [online]. 2012, vol. 37, issue 1, s. 19-27 [cit. 2014-03-27]. DOI: 10.1016/j.renene.2011.06.045. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S096014811100382X>
- [27] BALLESTEROS, M., Ashish SHUKLA, Sapna TIWARI a Monika SRIVASTAVA. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Bioalcohol Production* [online]. Elsevier, 2010, vol. 15, issue 5, s. 159 [cit. 2014-03-30]. DOI: 10.1533/9781845699611.2.159. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779997010329>
- [28] TEERI, Tuula T., Ashish SHUKLA, Sapna TIWARI a Monika SRIVASTAVA. Crystalline cellulose degradation: new insight into the function of cellobiohydrolases. *Trends in Biotechnology* [online]. 1997, vol. 15, issue 5, s. 160-167 [cit. 2014-03-30]. DOI: 10.1016/S0167-7799(97)01032-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032114000628>
- [29] ČALOVÁ, Iveta. *Využití Zymomonas mobilis pro produkci bioethanolu z celulóзовých materiálů*. Brno: Vysoké učení technické, Fakulta chemická, 2012.
- [30] SZCZODRAK, Janusz a Jan FIEDUREK. Technology for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. *Biomass and Bioenergy* [online]. 1996, vol. 10, 5-6, s. 367-375 [cit. 2014-03-30]. DOI: 10.1016/0961-9534(95)00114-X.
- [31] KAŠTÁNEK, František. *Bioinženýrství*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2001, 334 s. ISBN 80-200-0768-7.
- [32] Vsádková a přítokovaná kultivace. In: [online]. 2010 [cit. 2014-04-06]. Dostupné z: <http://www.primat.cz/vscht/predmety/kultivacni-techniky-q14744/3-vsadkova-a-pritokovana-kultivace-m39691/>
- [33] HAMELINCK, Carlo N, Geertje van HOOIJDONK a André PC FAAIJ. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass and Bioenergy* [online]. 2005, vol. 28, issue 4, s. 384-410 [cit. 2014-03-30]. DOI: 10.1016/j.biombioe.2004.09.002. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/096195349500114X>
- [34] D'AMORE, Tony, Graham G. STEWART a André PC FAAIJ. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Enzyme and Microbial Technology* [online]. 1987, vol. 9, issue 6, s. 322-330 [cit. 2014-03-30]. DOI: 10.1016/0141-0229(87)90053-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0141022987900536>
- [35] REBROŠ, Martin, Michal ROSENBERG, Ludmila KRIŠTOFÍKOVÁ a Radek STLOUKAL. Mikrobiálna produkcia palivového ethanolu: Bakterie alebo kvasinky?. *Chemické listy*. 2005, 402 – 409. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2005_06_402-409.pdf
- [36] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.
- [37] JANDEROVÁ, Blanka a Olga BENDO VÁ. *Úvod do biologie kvasinek*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999. ISBN 80-718-4990-1.
- [38] Buněčný metabolismus. Biomach, výpisky z biologie [online]. 2005– [cit. 2014-04-02]. Dostupné z <http://www.biomach.cz/biologie-bunky/bunecny-metabolismus>.
- [39] RYCHTERA, Mojmir a Jan PÁCA. *Bioinženýrství kvasných procesů*. 2. opr. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 1987.
- [40] EXNAR, Petr , et al. *Praktická lihovarnická příručka*. Praha : Agrospoj Těšnov, 1998. Technologie výroby lihu, s. 143-174.
- [41] SOMMER, Lumír. *Základy analytické chemie*. Vyd. 1. Brno: VUTIUM, 1998. ISBN 80-214-1300-X.

- [42] ČÁSLAVSKÝ, Josef. Instrumentální a strukturní analýza [online]. 2012, [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/elearning/mod/resource/view.php?id=190564>
- [43] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 199 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [44] VOLKA, Karel. *Analytická chemie II*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 1995, 236 s. ISBN 80-708-0227-8.
- [45] Novozymes®. Novozymes® biomass kit: Application Sheet. *Enzymes for hydrolysis of lignocellulosis materials*.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Modrý kontejner na sběrový papír	9
Obrázek 2: Struktura lignocelulózy [11]	10
Obrázek 3: Struktura celulózy [13]	11
Obrázek 4: Struktura hemicelulózy [13]	11
Obrázek 5: Strukturní jednotky ligninu. [16]	12
Obrázek 6: Ukázka průběhu předúpravy lignocelulóзовého materiálu. [17].....	12
Obrázek 7: Mechanismus působení celulóзовého komplexu [29]	16
Obrázek 8: Schéma vsádkového způsobu. [31]	17
Obrázek 9: Buňky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
Obrázek 10: Glykolýza [38]	19
Obrázek 11: Růstová křivka – vsádková kultivace	20
Obrázek 12: Schéma turbidimetru, kde I_0 je intenzita záření zdroje a I je intenzita prošlého záření [42].....	21
Obrázek 13: Schéma kapalinového chromatografu [42]	22

Seznam tabulek

Tabulka 1: Eluotropní řada [42]	22
Tabulka 2: Klasifikace a vlastnosti enzymů [45]	24
Tabulka 3: Složení média pro <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
Tabulka 4: Kalibrační roztoky glukózy a ethanolu	26
Tabulka 5: Podmínky a parametry analýzy HPLC	30
Tabulka 6: Závislost optické hustoty na čase	31
Tabulka 7: Stanovení gramáže papíru	33
Tabulka 8: Stanovení sušiny papíru	34
Tabulka 9: Stanovení popela papíru	34
Tabulka 10: Stanovení obsahu celulózy v papíru	36
Tabulka 11: Kalibrační řada – glukóza	37
Tabulka 12: Kalibrační řada – ethanol	38
Tabulka 13: Průběh tvorby glukózy z kancelářského papíru	39
Tabulka 14: Průběh tvorby glukózy z nerecyklovaného sešitu	40
Tabulka 15: Průběh tvorby glukózy z recyklovaného sešitu	41
Tabulka 16: Průběh tvorby glukózy z novin	42
Tabulka 17: Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu z kancelářského papíru	47
Tabulka 18: Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu z nerecyklovaného sešitu	50
Tabulka 19: Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu z recyklovaného sešitu	53
Tabulka 20: Průběh spotřeby glukózy a tvorby ethanolu z novin	56
Tabulka 21: Srovnání konečné koncentrace ethanolu	61

Seznam grafů

Graf 1: Růstové křivky <i>Saccharomyces cerevisiae</i> při různých teplotách	32
Graf 2: Kalibrační křivka sušiny biomasy při 35 °C	32
Graf 3: Závislost množství sušiny biomasy na čase při různých teplotách	33
Graf 4: Závislost obsahu popela na druhu papíru a typu předúpravy.....	35
Graf 5: Závislost obsahu celulózy na druhu papíru a typu předúpravy.....	36
Graf 6: Kalibrační křivka – glukóza.....	37
Graf 7: Kalibrační křivka – ethanol.....	38
Graf 8: Závislost tvorby glukózy na čase z kancelářského papíru	39
Graf 9: Závislost tvorby glukózy na čase z nerecyklovaného sešitu.....	40
Graf 10: Závislost tvorby glukózy na čase z recyklovaného sešitu.....	41
Graf 11: Závislost tvorby glukózy na čase z novin	42
Graf 12: Závislost tvorby glukózy ze všech papírů s předúpravou mletí.....	43
Graf 13: Závislost tvorby glukózy ze všech papírů s předúpravou mikrovlny + NaOH.....	43
Graf 14: Závislost tvorby glukózy ze všech papírů s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄	44
Graf 15: Závislost tvorby glukózy ze všech papírů s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH	45
Graf 16: Celkové srovnání konečných koncentrací glukózy.....	45
Graf 17: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z kancelářského papíru s předúpravou mletí.....	48
Graf 18: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z kancelářského papíru s předúpravou mikrovlny + NaOH.....	48
Graf 19: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z kancelářského papíru s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄	49
Graf 20: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z kancelářského papíru s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH.....	49
Graf 21: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z nerecyklovaného sešitu s předúpravou mletí.....	51
Graf 22: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z nerecyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + NaOH.....	51
Graf 23: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z nerecyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄	52
Graf 24: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z nerecyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH.....	52
Graf 25: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z recyklovaného sešitu s předúpravou mletí	54
Graf 26: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z recyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + NaOH.....	54
Graf 27: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z recyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄	55
Graf 28: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z recyklovaného sešitu s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH.....	55
Graf 29: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z novin s předúpravou mletí	57
Graf 30: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z novin s předúpravou mikrovlny + NaOH	57
Graf 31: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z novin s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄	58
Graf 32: Závislost koncentrace glukózy a ethanolu z novin s předúpravou mikrovlny + H ₂ SO ₄ + NaOH	58
Graf 33: Celkové srovnání konečných koncentrací ethanolu.....	59